

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**BIOLOGIA DOS COLÉTERES FOLIARES EM RUBIACEAE DE CERRADO E
FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECÍDUA DO ESTADO DE SÃO PAULO**

FERNANDA TRESMONDI

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Morfologia e
Diversidade Vegetal.**

**BOTUCATU – SP
-2015-**

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**BIOLOGIA DOS COLÉTERES FOLIARES EM RUBIACEAE DE CERRADO E
FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECÍDUA DO ESTADO DE SÃO PAULO**

FERNANDA TRESMONDI

PROF^a DR^a SILVIA RODRIGUES MACHADO (ORIENTADORA)

PROF^a DR^a ELZA MARIA GUIMARÃES SANTOS (COORIENTADORA)

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Morfologia e
Diversidade Vegetal.**

**BOTUCATU – SP
-2015-**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tresmondi, Fernanda.

Biologia dos coléteres foliares em Rubiaceae de cerrado e floresta estacional semidecidual do estado de São Paulo / Fernanda Tresmondi. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Silvia Rodrigues Machado

Coorientador: Elza Maria Guimarães Santos

Capes: 20300000

1. Rubiácea. 2. Secreção. 3. Ultraestrutura (Biologia).
4. Coléteres. 5. Plantas dos cerrados.

Palavras-chave: Coléter; Rubiaceae; Secreção; Ultraestrutura.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado, pela orientação dedicada, dividindo seus conhecimentos e assim, ampliando os meus. Por me fornecer meios e ideais na linha de pesquisa com estruturas secretoras. Pelo acolhimento durante o doutorado, amizade e força que foram determinantes no meu processo de aprendizado diante de todas as expectativas e dificuldades que enfrentei neste período. Muito obrigada!

À minha coorientadora, Profa. Dra. Elza Maria Guimarães pelas várias horas de discussão e orientação em Ecologia. Por acreditar em mim e me estimular a pensar na melhor maneira de desenvolver este estudo. Pela amizade, carinho e paciência e, principalmente, pela disposição sincera em ajudar sempre.

Ao Dr. Anselmo Nogueira, pela paciência que teve durante horas de conversa e ajuda com as análises dos dados que refletiram em contribuições valiosíssimas para a elaboração desta tese.

À Yve Canaveze, pela ajuda inestimável. Agradeço pela convivência amiga, pelos conselhos no início do doutorado, pela confiança que estabelecemos uma com a outra, que me fez admirá-la. Agradeço, ainda, pelas contribuições em trabalhos e relatórios, e especialmente, pela ajuda na elaboração das pranchas no período final da tese.

À Profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues pelo auxílio com técnicas laboratoriais e esclarecimentos de dúvidas ao longo do doutorado e pela oportunidade de ministrar cursos e aulas.

Aos colegas que me acompanharam em trabalhos de campo, Fábio Bosio, Sérgio Adachi, Walney Jorge, Angélica Lino Rodrigues e César Claro sem os quais não teria sido capaz de realizar as visitas, coletas e herborização do material.

Aos alunos do laboratório de Anatomia Vegetal e de Ecologia Vegetal pelo agradável convívio e colaboração em diversas etapas deste estudo.

Ao Sr. Clemente por me ajudar a encontrar as populações das espécies selecionadas para este estudo.

Ao Dr. Joecildo Francisco Rocha pelos ensinamentos com as técnicas de histoquímica.

Ao Plácido, por ser meu companheiro de todas as horas, desde coletas em campo, processamento do material até discussão dos resultados. Por estar ao meu lado no momento mais feliz e mais preocupante da minha vida me dando força e incentivo sempre com tanto amor e bom humor que trouxe leveza e ânimo em momentos que pensei não ser capaz de continuar.

À toda minha família, especialmente, aos meus pais, irmã e tia Irene que sempre estiveram ao meu lado, dando suporte emocional e físico.

Às amigas, Sandra Minobe, Larissa Dória e Bárbara Moura pela compreensão e colaboração nas tarefas diárias, pela amizade e convívio agradável que nos tornou irmãs de vida, independente da distância.

Às amigas do Instituto de Botânica de São Paulo, Dra. Edenise Segala Alves, Dra. Adriana Hayashi, Dra. Andrea Pedroso e Dra. Poliana Cardoso pelo incentivo, força e esclarecimentos de técnicas laboratoriais.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu pelo processamento das amostras de microscopia eletrônica.

À Fundação de Amparo e Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 2011/02488-5) e financiamento do Projeto Temático 2008/55434-7.

Ao CNPq pela verba concedida pelo Processo 473289/2010.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 2 |
| ABSTRACT | 4 |
| INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| CONSIDERAÇÕES INICIAIS | 10 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 11 |
| | |
| Capítulo I – “Stipular colleters in Rubiaceae species from forest and savanna: an integrative approach combining morphological, chemical and ecological aspects” | 16 |
| Abstract | 17 |
| Introduction | 18 |
| Material and methods | 19 |
| Results | 23 |
| Discussion | 26 |
| Concluding remarks | 30 |
| Acknowledgments | 30 |
| References | 31 |
| Tables and Figures | 34 |
| | |
| Capítulo II – “Caracterização subcelular e ultracitoquímica de coléteres padrão em espécies de Rubiaceae” | 48 |
| Resumo | 49 |
| Introdução | 50 |
| Material e métodos | 52 |
| Resultados | 53 |
| Discussão | 57 |
| Agradecimentos | 60 |
| Referências bibliográficas | 60 |
| Tabela e figuras | 64 |
| | |
| Capítulo III “Investigating leaf nodulating and non-nodulating bacteria in Neotropical species of Rubiaceae” | 75 |
| Introduction | 76 |
| Material and methods | 77 |
| Results | 78 |
| Discussion | 78 |
| Acknowledgment | 80 |
| References | 80 |
| Table and Figure | 84 |
| | |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 86 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 87 |

À Ceci, serzinho que tem me ensinado a ver com outros olhos a ciência e a “não-ciência” das coisas, me mostrando o lado mais misterioso da vida, com sua delicada imensa força pulsante indescritivelmente única e milagrosa, dedico.

RESUMO E ABSTRACT

TRESMONDI, F. **BIOLOGIA DOS COLÉTERES FOLIARES EM RUBIACEAE DE CERRADO E FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECÍDUA DO ESTADO DE SÃO PAULO.** 2015. 93P. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO – Coléteres são estruturas responsáveis pela secreção de substância mucilaginosa ou resinosa, geralmente associados com a proteção ao meristema e aos órgãos em desenvolvimento contra dessecação e danos por patógenos, herbívoros, e ainda, com a formação de nódulos bacterianos foliares. Compostos adicionais como alcaloides, compostos fenólicos e lipídios podem estar presentes na secreção dos coléteres. As variações na composição indicam especificidade na função e nos mecanismos subcelulares de síntese e liberação da secreção dos coléteres de diferentes espécies. Em Rubiaceae os coléteres variam quanto à morfologia podendo ser classificados como: padrão, padrão-reduzido, intermediário, filiforme, escova, dendroide e lacrimiforme. Neste estudo foram comparadas 17 espécies de Rubiaceae ocorrentes em cerrado e floresta estacional semidecídua. Foram avaliadas morfologia, distribuição e histoquímica dos coléteres estipulares usando microscopia óptica e eletrônica de varredura. Para avaliação dos mecanismos subcelulares das células secretoras dos coléteres, foram selecionadas oito espécies com coléteres padrão com variação na natureza da secreção, as quais foram submetidas a análises em microscópio eletrônico de transmissão com uso de técnicas convencionais e citoquímicas – ZIO para marcação do sistema de endomembranas, ósmio-imidazol para lipídios insaturados e Thiéry para polissacarídeos. Além disso, foi realizado acompanhamento *in situ* do microclima, período de brotamento de novas folhas e proporção de ápices danificados em ambos os ecossistemas ao longo de um ano. Dentre as 17 espécies estudadas, 14 apresentaram coléteres padrão com variação na distribuição e no tamanho. A secreção variou de predominantemente hidrofílica, mista ou predominantemente lipofílica. Esta variação refletiu em diferenças nas populações de organelas entre as espécies, principalmente, com relação ao número e aspecto dos plastídios, dictiossomas e retículo endoplasmático incluindo as vesículas associadas a estes. Sítios de acúmulo de secreção foram evidentes na parede periclinal externa das células epiteliais, especialmente na camada basal, podendo se estender para a camada fibrosa e estrato cuticular. Cutícula propriamente dita se manteve intacta. Esses resultados comprovam a participação da parede periclinal externa no acúmulo temporário e liberação da secreção. Nossos resultados mostraram que coléteres morfologicamente semelhantes possuem particularidades subcelulares associadas com a natureza da secreção. Verificou-se uma prevalência de espécies com lipídios e resina na secreção associada com maior luminosidade e

menor proporção de ápices danificados em espécies do cerrado. Distintamente, no ecossistema florestal verificamos associação entre maior umidade relativa do ar e maior proporção de ápices danificados e ausência de lipídios e resinas. Os resultados mostram que coléteres com morfologia semelhante claramente diferem em secreções, apresentando padrões diferentes em cerrado e floresta, sugerindo funções específicas destas estruturas em cada ecossistema. A função de proteção foi mais evidente no cerrado, enquanto na floresta o papel destas estruturas secretoras não apresentou clara definição.

Palavras-chave: coléter, Rubiaceae, secreção, ultraestrutura, anatomia.

TRESMONDI, F. **BIOLOGY OF LEAF COLLETTERS IN CERRADO RUBIACEAE AND FOREST SEMIDECIDUOS THE STATE OF SÃO PAULO.**2015. 93P. THESIS – BIOSCIENCES INSTITUTE, UNESP – SÃO PAULO STATE UNIVERSITY, BOTUCATU.

Collecters are responsible for the secretion of mucilaginous or resinous substance, usually associated with the protection of the meristem and developing organs against desiccation and damage by pathogens, herbivores, and also with the formation of bacterial leaf nodes. Additional compounds such as alkaloids, lipids and phenolic compounds may be present in the secretion of collecters. Variations in the composition to indicate the specificity and subcellular mechanisms for synthesis and release of collecters secretion of different species. In Rubiaceae collecters can be classified as: standard, reduced standard, intermediate, brush-like, winged, filiform, dendroid and lacrimiforme. This study compared 17 species of Rubiaceae occurring in savanna and semi-deciduous forest. Were evaluated morphology, distribution and histochemistry of stipular collecters using optical and scanning electron microscopy. To evaluate the subcellular mechanisms of the secretory cells of collecters eight species were selected with standard collecters with variation in the nature of secretion, which were subjected to analysis in a transmission electron microscope using conventional and cytochemical techniques - ZIO for marking endomembrane systems, osmium-imidazole for unsaturated lipids and polysaccharides to Thiéry. Moreover, *in situ* monitoring was performed microclimate, budding period and proportion of new leaves damaged apices on both ecosystems throughout a year. Among the 17 species studied, 14 showed collecters standard with variation in the distribution and size. The secretion varied from predominantly hydrophilic, mixed to predominantly lipophilic. This secretion variation reflected in differences in the populations of organelles between species, mainly on the number and appearance of plastids, endoplasmic reticulum and dictyosomes including vesicles associated with these. Secretion accumulation sites were evident in the outer periclinal wall of epithelial cells, especially in the basal layer, and may extend to the fibrous layer and cuticle. Cuticle remained intact. These results prove the participation of external periclinal wall in the temporary accumulation and release of secretion. Our results showed that morphologically similar collecters have subcellular characteristics associated with the nature of secretion. A prevalence of species with lipids and resin secretion associated with higher luminosity and lower proportion of damaged apices in savanna species was found. Distinctively, in the forest ecosystem we found association between higher relative humidity and higher proportion of damaged apices and absence of lipids and resins. This study highlight that collecters with similar morphology clearly differed in secretions, showing different patterns in savanna and forest, suggesting specific roles of these structures in each ecosystem.

The protective function was more obvious in savanna, while in forest the role of these secretory structures appears unclear.

Key-words: colleter, Rubiaceae, secretion, ultrastructure, anatomy.

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Coléteres são definidos como estruturas secretoras de origem epidérmica ou mista, vascularizadas ou não, pedunculadas ou sésseis, que apresentam atividade secretora em fase inicial de desenvolvimento do órgão ao qual estão inseridas (Fahn 1979). O que diferencia os coléteres das demais estruturas secretoras é a composição do exsudato que pode ser constituída unicamente por mucilagem (Fahn 1979, Thomas 1991) ou uma mistura de mucilagem e resinas (Fahn 1990, Kronstedt-Robards & Robards 1991).

Diversos grupos de plantas possuem coléteres nos tecidos vegetativos tais como: Apocynaceae, Passifloraceae, Rosaceae, Melastomataceae, Turneraceae, Rhizophoraceae, Orchidaceae, sendo amplamente distribuídos na família Rubiaceae (Thomas 1991). A presença de coléteres na superfície adaxial das estípulas interpeciolares do ápice vegetativo é uma das características mais importantes de Rubiaceae, que a distingue da maioria das outras famílias (Robbrecht 1988). Nesta família, os coléteres ocorrem quase exclusivamente na superfície adaxial ou na margem das estípulas (Horner & Lersten 1968, Lersten 1974a, Thomas 1991, Klein et al. 2004) pecíolos (Johansson 1987), cálice (Robbrecht 1987, Dave *et al.* 1988), brácteas (Barreiro & Machado 2007), bractéolas e corola (Thomas & Dave 1989)

Para Rubiaceae, Thomas (1991) utilizou as seguintes terminologias para se referir aos diferentes tipos de coléteres: (1) tipo padrão, é o mais comum, e se caracteriza por ser multicelular composto por um eixo central parenquimático, sustentado por um pedúnculo, envolto por células epidérmicas com atividade secretora; (2) padrão-reduzido o qual é alongado e estreito com células epidérmicas quase tão delgadas quanto às células do eixo central; (3) dendroides, multicelulares e multisseriados e consistem de duas a quatro células espessas na região central, de onde partem células secretoras ramificadas e alongadas unidas entre si pela base; (4) intermediários que estão entre os tipos padrão e dendroide (5) tipo-escova, são coléteres com ápice reduzido e células epidérmicas alongadas; (6) os coléteres alados e (7) os coléteres filiformes são extremamente reduzidos e com eixo estreito de células alongadas emergindo de uma base pouco mais ampla de células isodiamétricas (Lersten 1974a, Thomas 1991). Recentemente, foi adicionado aos coléteres de Rubiaceae o tipo lacrimiforme, descrito como uma estrutura cilíndrica

de base estreita e ápice pontiagudo (Miguel et al. 2009), utilizando como referência a terminologia proposta por González (1998) para a família Turneraceae.

De maneira geral, os coléteres em fase ativa de secreção são caracterizados ultraestruturalmente por apresentarem citoplasma denso com material fibrilar típico de composição polissacarídica, muitos dictiosomos associados às vesículas que atuam no processo de exocitose, retículo endoplasmático liso e rugoso, mitocôndrias com cristas dilatadas, núcleo evidente e parede celular delgada conectada por plasmodesmos, além da presença de ramificações ou microcanais na parede periclinal externa (Klein et al. 2004, Paiva e Machado 2006, Machado et al. 2012, Miguel et al. 2006, Paiva 2012, Mayer et al. 2013). A secreção pode ser do tipo granulócrina (Coelho et al. 2013, Paiva & Machado 2006), ou granulócrina e écrina, como em *Alibertia sessilis*, espécie que possui resina associada à mucilagem liberada pelos coléteres (Machado et al. 2012). Pode haver ainda, transporte dos produtos de secreção pelo retículo endoplasmático que se funde com a membrana plasmática liberando a secreção (Miguel et al. 2006, Machado et al. 2012). Quanto ao mecanismo de liberação da secreção para o meio externo, pouco tem sido descrito, sendo que a maior parte dos trabalhos aborda desarranjo da parede periclinal externa e cutícula com ou sem ruptura (Paiva 2012, Miguel et al. 2010). Lersten & Horner (1967) verificaram que em *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae) os coléteres estipulares são dendroides e não possuem cutícula, fato que determina a rápida degeneração dessas estruturas, por dessecação, após a expansão dos primórdios foliares. Desta forma, as variações nas populações de organelas e nas características da parede celular, que são descritas na maioria dos estudos mencionados, indicam que existam diferenças nos processos de síntese e liberação da secreção dos coléteres em diferentes espécies.

A função de lubrificação de órgãos jovens em desenvolvimento é bem conhecida para os coléteres. No entanto, alguns estudos sugerem que esta função esteja relacionada com a proteção de meristemas e órgãos em desenvolvimento frente aos herbívoros e patógenos (Thomas & Dave 1989, Thomas 1991, Paiva 2009, 2012, Mayer et al. 2013), ou ainda, com a formação de nódulos bacterianos foliares (Lemaire et al. 2012a,b). A formação de nódulos bacterianos foliares ocorre quando a secreção polissacarídica liberada pelos coléteres é utilizada como recurso alimentar pelas bactérias e atua como meio de entrada destas nas folhas através dos estômatos dos primórdios foliares (Lersten e Horner 1967, Thomas 1991). Lersten (1974b)

investigou a associação dos coléteres dendroides ou tipo-escova com espécies noduladas e encontrou uma correlação muito forte em *Pavetta* e *Psychotria*, mas fraca em *Neorosea*: a maioria das espécies noduladas apresentou coléteres dendroides ou tipo-escova, mas os tipos padrão e intermediário também ocorreram, embora em menor frequência. Van Oevelen et al. (2003) ao impedir experimentalmente a formação de nódulos em indivíduos de *Psychotria kirkii*, observaram que a ausência desta associação causa prejuízo no desenvolvimento e expansão foliar com conseqüente redução do metabolismo e crescimento da planta, refletindo em um fenótipo anormal até que a associação seja restabelecida, evidenciando uma relação de simbiose obrigatória. Estudos moleculares mostraram que bactérias simbiotes do gênero *Burkholderia* são responsáveis pela nodulação em folhas de Rubiaceae (Van Oevelen et al., 2004; Lemaire et al. 2011, 2012a, b).

Além da composição polissacarídica, substâncias adicionais podem estar presentes na secreção dos coléteres. Estudos evidenciaram a presença de compostos fenólicos, lipídios, pectinas e proteínas, (Machado et al. 2012, Martins 2012, Mayer et al. 2011), iridoides, triterpenos e esteroides (Muravnik et al. 2014) o que sugere que coléteres com diferenças na composição da secreção, possam ter funções específicas e ainda não bem definidas. A composição da secreção pode, ainda, variar entre os coléteres presentes nos ápices vegetativos e reprodutivos de uma mesma espécie (Machado et al. 2012). Assim, os coléteres representam uma importante estrutura de defesa vegetal, uma vez que se diferenciam no início do desenvolvimento dos ápices vegetativos e se mantêm ativos durante o período de expansão foliar (Thomas, 1991), evitando danos aos ápices e folhas em expansão reduzindo prejuízos na atividade fotossintética futura (Coley & Kursar 1996). No entanto, não há evidências claras de uma relação entre a presença de coléteres maior proteção para o ápice na fase de brotamento das plantas. Poucos estudos tiveram como pergunta principal a funcionalidade dos coléteres de ápices vegetativos, considerando as variações na natureza da secreção entre espécies de Rubiaceae. Neste contexto, Klein et al. (2004), avaliaram três espécies do gênero *Simira* ocorrendo no mesmo ambiente e observaram que os coléteres do tipo padrão variaram entre as espécies quanto à distribuição nas estípulas e vascularização, mas não relataram diferenças na composição da secreção. Já, em indivíduos de *Psychotria carthagenensis* ocorrentes em Floresta Ombrófila Densa, Restinga e

Ambiente Reofítico, os coléteres apresentaram secreção polissacarídica, independentemente do ambiente de ocorrência (Vitarelli & Santos 2009).

Portanto, o presente trabalho objetivou estudar coléteres presentes nas estípulas de ápices vegetativos de 17 espécies de Rubiaceae ocorrentes em cerrado e floresta estacional semidecídua do estado de São Paulo. Pretendeu-se investigar se os tipos morfológicos dos coléteres estariam relacionados com a natureza da secreção; analisar as características ultraestruturais das células secretoras e compreender os processos envolvidos na síntese, transporte intercelular e na eliminação da secreção a partir do protoplasto; e ainda, avaliar o ciclo secretor dos coléteres e o papel destas estruturas nas interações ecológicas.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Conforme estabelecido pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), os resultados obtidos neste trabalho estão sendo apresentados na forma de artigos segundo as normas das revistas científicas na área de botânica para a qual estão sendo submetidos.

O primeiro capítulo intitulado: **“Stipular colleters in Rubiaceae species from forest and savanna: an integrative approach combining morphological, chemical and ecological aspects”** foi submetido ao periódico *Botanical Journal of Linnean Society*.

O segundo capítulo intitulado: **“Caracterização subcelular e ultracitoquímica de coléteres padrão em espécies de Rubiaceae”** foi elaborado segundo as normas do periódico *International Journal of Plant Sciences*.

O terceiro capítulo foi redigido na forma de nota científica intitulada: **“Investigating leaf nodulating and non-nodulating bacteria in Neotropical species of Rubiaceae”**, de acordo com as normas do periódico *Botany*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barreiro D.P., Machado S.R. 2007.** Coléteres dendroides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. *Revista brasileira de Botanica*. 30:387-399.
- Coelho V.P.M, Leite J.P.V., Fietto L.G., Ventrella M. C. 2013.** Colleters in *Bathysa cuspidata* (Rubiaceae): Development, ultrastructure and chemical composition of the secretion . *Flora* 208 : 579 – 590.
- Coley, P.D. & Kursar, T.A. 1996.** Anti-herbivore defences of young tropical leaves: physiological constrains and ecological tradeoffs. *Tropical Forest Plant Ecophysiology* (eds S.S. Mulkey & R.L. Chazdon), pp. 305–336.
- Dave Y., Kuriachen P.M., Thomas V. 1988.** Development, structure and senescence of colleters in *Gardenia lucida* Roxb. (Rubiaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 57:3-7.
- Fahn A. 1979.** Secretory tissues in plants. London: Academic Press.
- Fahn A. 1990.** Plant anatomy. Oxford: Pergamon Press.
- González A.M. 1998.** Colleters in *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 128: 215-228.
- Horner H.T., Lersten N.R. 1968.** Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 55: 1089–1099.
- Johansson J.T. 1987.** Revision of the genus *Prismatomeris* Thw. (Rubiaceae, Morindeae). *Opera Botanica* 94:1-62.
- Klein D.E., Gomes V.M., Silva-Neto S.J., Cunha M. 2004.** The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany* 94: 733–740.

- Kronstedt-Robards E, Robards A. 1991.** Exocytosis in gland cells. In Endocytosis, exocytosis and vesicle traffic in plants (C. Hawea, J. Coleman & D. Evans, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, p.199-232.
- Lemaire B., Robbrecht E., van Wyk B., Van Oevelen S., Verstraete B., Prinsen E., Smets E., Dessein S. 2011.** Identification, origin and evolution of leaf nodulating symbionts of *Sericanthe* (Rubiaceae). *J Microbiol* **49**: 935–941.
- Lemaire B., Van Oevelen S., De Block P., Verstraete B., Smets E., Prinsen E., Dessein S. 2012a.** Identification of the bacterial endosymbionts in leaf nodules of *Pavetta* (Rubiaceae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**: 202–209.
- Lemaire B., Lachenaud O., Persson C., Smets E., Dessein S. 2012b.** Screening for leaf-associated endophytes in genus *Psychotria* (Rubiaceae). *FEMS Microbiology Ecol.* **81** (2):364-72.
- Lersten N.R. 1974a.** Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodules in *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* **61**: 973-981.
- Lersten N.R. 1974b.** Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **69**: 21 125-136.
- Lersten NR, Horner HT. 1967.** Development and structure of bacterial leaf nodules in *Psychotria bacteriophila* Val. (Rubiaceae). *Journal of Bacteriology* **94**: 2027–2036.
- Machado S.R., Barreiro D.P., Rocha J.F., Rodrigues T.M. 2012.** Dendroid colleters on vegetative and reproductive apices in *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) differ in ultrastructure and secretion. *Flora* **207**: 868– 877.
- Martins F.M. 2012.** Leaf and calycine colleters in *Odontadenia lutea* (Apocynaceae – Apocynoideae – Odontadenieae): their structure and histochemistry. *Brazilian Journal of Botany* **35**(1):59-69.

- Mayer J.M.S., Cardoso-Gustavson P., Appezzato-da-Gloria B. 2011.** Colleters in monocots: New record for Orchidaceae. *Flora* 206:185–190.
- Mayer J.L.S., Carmello-Guerreiro S.M., Mazzafera P. 2013.** A functional role for the collectors of coffee flowers. *AoB PLANTS* 5: plt029; doi:10.1093/aobplat/plt029
- Miguel E.C., Gomes V.M., Oliveira M.A., Da Cunha M. 2006.** Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): Ultrastructure, Secretion Protein Composition, and Antifungal Activity. *Plant Biol.* 8: 715–722.
- Miguel E.C., Moraes, D.G., Da Cunha M. 2009.** Stipular collectors in *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra (Rubiaceae): micromorphology, anatomy and crystals microanalysis. *Acta Botanica Brasilica*. 23(4): 1034-1039.
- Miguel E.M., Klein D.E., Oliveira M.A., Da Cunha M. 2010.** Ultrastructure of secretory and senescence phase in collectors of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulata* (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 33: 425-436.
- Muravnik L.E., Kostina O.V., Shavarda A.L. 2014.** Development, structure and secretion compounds of stipule collectors in *Pentas lanceolata* (Rubiaceae). *South African Journal of Botany* 93: 27-36.
- Paiva E.A.S, Machado S.R. 2006.** Colleter in *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae): ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology* 66: 301-308.
- Paiva E. A. S. 2009.** Occurrence, structure and functional aspects of the collectors of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, caesalpinioideae). *C. R. Biol.* 332: 1078–1084.
- Paiva E.A.S. 2012.** Colleters in *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae): structure, secretion and evidences for young leaf protection. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 139(1):1-8.

- Robbrecht E. 1987.** The African genus *Tricalysia* A. Rich. (Rubiaceae). A revision of the species of section *Tricalysia* and section *Rosea*. Bulletin van Nationale Plantentuin van België 57: 39–208.
- Robbrecht E. 1988.** Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. Opera Botanica Belgica 1: 1–271.
- Thomas V. 1991.** Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleters. Annals of Botany 68: 287–305.
- Thomas V, Dave Y. 1989.** Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland Apocynaceae). *Korean Journal of Botany* 32: 163-172.
- Van Oevelen, S., De Wachter, P., Robbrecht, E., Prinsen, E. 2003.** Induction of a crippled phenotype in *Psychotria* (Rubiaceae) upon loss of the bacterial endophyte. *Bulgary Journal Physiology. Especial issue*: 242–24.
- Van Oevelen S., De Wachter R., Vandamme P., Robbrecht E., Prinsen, E. 2004.** Candidatus *Burkholderia calva* and ‘Candidatus *Burkholderia nigropunctata*’ as leaf gall endosymbionts of African *Psychotria*. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2237–2239.
- Vitarelli N.C., Santos M. 2009.** Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria cartagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasílica* 23: 923-928.

Capítulo I

Chapter I

Elaborado segundo as normas do periódico *Botanical Journal of Linnean Society*

Stipular colleters in Rubiaceae species from forest and savanna: an integrative approach combining morphological, chemical and ecological aspects

ABSTRACT

Colleters are secretory structures that produce and release mucilage or a mucilage-resin mixture protecting meristems and young structures against desiccation, herbivores and pathogens. The secretions may vary in colleters of same or different types, indicating that the functionality of colleters may be more specific than previously thought. In this study we compared 17 Rubiaceae species from savanna and forest environment focusing on colleters secretions and its ecological role. We evaluated the morphology, distribution and histochemistry of stipular colleters using light and scanning electron microscopy. Additionally, we investigated the phenology, microclimate and the proportion of damaged apices in both ecosystems. We recorded standard-type colleters in 14 out of the 17 species studied, variable in distribution and size. The secretion varied from predominantly hydrophilic, mixed to predominantly lipophilic. During the budding period, abundant secretion covered the vegetative apices. We verified a prevalence of lipid and resin secretion associated with higher luminosity and lower proportion of damaged apices in savanna species. In forest we verified association among higher relative humidity and higher proportion of damaged apices and absence of lipids and resins. This study highlight that colleters with similar morphology clearly differed in secretions, showing different patterns in savanna and forest, suggesting specific roles of these structures in each ecosystem. The protective function was more obvious in savanna, while in forest the role of these secretory structures appears unclear.

Keywords: colleters, histochemistry, microclimate, phenology, secretion.

INTRODUCTION

Rubiaceae is the fourth-largest family of angiosperms and shows a cosmopolitan distribution, with approximately half of its species occurring in the Neotropics (Delprete and Jardim, 2012). This family is especially diverse and well represented in Brazilian savanna and tropical forests (Souza and Lorenzi, 2005). The presence of interpetiolar stipules with colleters is one of the most important vegetative characteristics of the family Rubiaceae, which distinguishes it from most other families (Robbrecht, 1988).

Colleters are secretory structures characterized by the production of mucilage or a mucilage-resin mixture (Fahn, 1979) and are present on the adaxial surface of vegetative and reproductive organs, protecting meristems and young structures against desiccation (Kronstedt-Robards and Robards, 1991), herbivores, and pathogens (Thomas 1991). Anatomically, colleters are described as emergences comprising a central, multiseriate, vascularized or not, parenchymatous axis covered by palisade-arranged epidermal cells that are specialized in secretion (Fahn, 1979). This structural organization characterizes the most common colleter type, designated the standard type (Evert, 2006). Based on morphology, the following other colleter types are recognized in Rubiaceae: reduced standard, dendroid, intermediate, brush-like, winged, filiform (Lersten, 1974; Thomas, 1991), and lachrymiform (Miguel *et al.*, 2009). The presence of crystals is common in colleters and represents a taxonomically relevant characteristic (Evert, 2006).

The shoot apex is essential for plant building and its damage is considered of high cost for the plant. Therefore, the apices could be associated with specific morphological and chemical features that would increase their protection or resistance against harmful agents such as herbivores, desiccation and sun radiation. In this case, the presence of colleters would be a potential character of protection to the apex of the plants. Colleters differentiate early in the shoot apices and are active in secretion in the developing leaves (Thomas, 1991); however there is no clear evidence of a relationship between their presence and increased protection to apex in the budding stage of the plants. In addition, there are no data on the proportion of damage to the apex and the secretion characteristics or the environment in which plants occur. These results demonstrate the need for integrative studies that associate the morphological type of colleters and their variations as well as the nature of the secretion with the environmental type where the species occur. At present, research

applying this approach is scarce, and the studies conducted by Klein *et al.* (2004) and Vitarelli and Santos (2009), who investigated the variation in secretions among species of the same genus and between environments, respectively, are noteworthy.

In this study, we characterized the morphotypes of stipular colleter found in Rubiaceae species in a seasonal semi-deciduous forest and savanna vegetation. The marginal areas south of the Cerrado Domain and the seasonal semi-deciduous forest are both characterized by marked climatic seasonality. However, the intense incidence of light in both strata (continuous herbaceous and sparse woody) in savanna generates a drier and hotter microclimate with high radiation (Coutinho, 1978; 2002) compared with the understory of the seasonal semi-deciduous forest, which is the stratum that harbors the species studied. Thus, we assessed whether colleters of the same morphotype differ in regard to the nature of the secretions produced when comparing species from these two environments with distinct microclimate. Additionally, we tested if there is association among the proportion of damage apices, type of vegetation, microclimate and colleter secretions in Rubiaceae species.

MATERIALS AND METHODS

SPECIES SELECTION AND STUDY AREA

For the present study, we selected 17 Rubiaceae species (Table 1): nine species from a seasonal semi-deciduous forest and eight species from savanna formations, locally named as ‘cerrado’, all located in central-western São Paulo state, Brazil (48°20’ to 48°50’W; 22°40’ to 23°05’S). The climate was characterized as Cfa hot climate with rains in the summer and drought in the winter, with average temperature in the hottest month above 22° C, with small hydric deficiency in April, July and August (Cunha and Martins, 2009). Data of monthly average temperature and monthly accumulated rainfall were obtained from ‘Estação de Radiometria Solar de Botucatu, Faculdade de Ciências Agrárias, UNESP’ (22°54' S; 48°27' W, 786 m altitude) to prepare a climate diagram (Figure 1) according to Walter and Lieth (1967).

For each study species five individuals were identified with numbered labels and monitored monthly from May 2011 to April 2012 (n = 85 plants, distributed in

five study areas). Phenology, collectors activity during budding and in young leaves, and microclimate nearby individuals were monthly registered in forest and savanna areas.

COLLETER DISTRIBUTION, MORPHOLOGY AND HISTOCHEMISTRY

We collected and dissected vegetative apex samples from the studied species during the budding period to evaluate the distribution, number, size and morphology of the stipule collectors. We analyzed three stipules per species under a stereoscopic microscope to count all the collectors on the stipule adaxial surface and to measure their sizes using a system with image capture and software for image processing.

We processed stipules samples for scanning electron microscopy (SEM) analyses. For this purpose, samples of the material were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, for 24 hours, then post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, for 1 hour, dehydrated in an ascending ethanol series, critical point dried using liquid CO₂, mounted on aluminum stubs, and gold sputtered (Robards, 1978). The material was observed and documented using a Quanta Fei scanning electron microscope at 20 kV.

For general histology of colleter, stipule samples were fixed in Karnovsky solution (4% paraformaldehyde; 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2; 0.2 M phosphate buffer, pH 7.2) for 24 hours (Karnovsky, 1965). We kept the samples fixed in 70% tertiary butyl alcohol for seven days, then dehydrated them in an ascending butyl series, transferred them to HistoClear®, and embedded them in Paraplast® (Johansen, 1940). Next, we cut 8- to 10-µm-thick sections using a semi-automatic rotary microtome and stained the sections with Astra blue and safranin.

We prepared permanent slides using Entelan® synthetic resin and then viewed and photographed them under a microscope coupled to a digital camera. We measured the length and width of the collectors of each species studied in longitudinal sections of the vegetative apex (n=5 per species), using the LAS measuring system, version 3.8.

We used sectioned material for *in situ* identification of the main chemical classes of compounds present in the collectors. For this purpose, we performed tests using the following histochemical stains: Sudan IV for total lipids (Pearse, 1980); the periodic acid/Schiff reagent (PAS) for neutral polysaccharides (Cortelazzo, 1992); ruthenium red for acid polysaccharides (Jensen, 1962); ferric chloride for

phenolic compounds (Johansen, 1940); mercuric bromophenol blue solution for proteins (Mazia *et al.*, 1953); tannic acid/iron chloride III for mucilages (Pizzolato and Lillie, 1973); the Dragendorff reagent for alkaloids (Svendsen and Verpoorte, 1983); and cupric acetate for resin (Johansen, 1940).

PHENOLOGY

We evaluated the phenology, according to Fournier (1974), focusing on budding phase. We investigated the presence and aspect of exudates covering the soot apices with the naked eye.

MICROCLIMATE

The temperature, relative humidity (RH) and luminosity were measured using portable thermometer, hygrometer and luximeter, respectively. Additionally, in the peak of dry period, when the apices were subjected to the higher insolation, the canopy covering was estimated using eye-fish lens. To determine the percentage of radiation in forest and savanna the image pixels were calculated using software for processing images.

PROPORTION OF DAMAGED APICES

For herbs, shrub and small trees (Table 1) having less than 40 branches all the vegetative apices were evaluated *in loco*. For greater trees, *Coussarea hydrangaeifolia*, *Guettarda viburnoides* e *Simira corumbensis*, 10 apices in each cardinal point of the plant were evaluated, totaling 40 apices sampled per tree. All the labeled plants were investigated for the presence of apex damage using portable magnifying glass. The evaluations were performed in the dry (Ago/Sep) and wet (Jan/Feb) periods.

We considered damaged apices those having injury, necrosis or total loss of tissue, regardless of their causes (eg herbivores, desiccation or ablation). The mean proportion of damaged apices in relation to the total number of sampled apices per species (n = 5 plants) was calculated in both periods, dry and wet.

DATA ANALYSIS

To analyze the temporal distribution of the vegetative apex budding circular statistics was employed. For this approach we consider the period of one year in a circular

scale of measurements (Batschelet, 1981; Zar, 2010). To adapt the data to the circular scale, we converted the days to the specific angle of the sampling day. For this calculation, the total angles of a circle (360°) was divided by the total number of days of the year (365), obtaining the value of 0.98 for each day of the year. Since our data was not normal, the data variation was described based on the median and quartiles. To determine the intensity of seasonality, we use the length of the vector (r). This parameter is a measure of the data concentration around the mean angle, and ranges from 0 (disaggregated data) to 1 (data concentrated in the same direction) (Zar, 2010). The distribution of data was verified by Watson test, based on the null hypothesis that the data follows the von Mises distribution (normal distribution analogous to the linear data). To investigate the occurrence of seasonality, we employ the Kuiper test, based on the null hypothesis that the data present uniformity, i.e. they are equally distributed around the circle (Jammalamadaka and SenGupta, 2001; Zar, 2010). The analyzes were performed using the computing environment R packages "circular" (Agostinelli and Lund, 2011) and "CircStats" (Jammalamadaka and SenGupta, 2001).

To compare the differences in the proportions of species with each chemical compound (lipids, resin, phenols and alkaloids) between the savanna and forest a binomial proportion test was applied. In order to check for differences in microclimate factors (maximum and minimum RH, maximum and minimum temperature, and maximum and minimum irradiation) around plants we used analyzes of variance (ANOVA one-way), in which the response variables were each quantitative descriptor of microclimate (maximum and minimum) and the independent variable was the vegetation type (savanna and forest). We also verify if the variation in the proportion of damaged apices could be explained by the presence of specific chemical compounds, the microclimate or the vegetation type (savanna and forest). As there was no significant difference in the proportion of damaged apices between the dry and wet period (paired t-test; $t = 1.3572$; d.f. = 16; $p = 0.19$), the mean value per species considering both periods was used as the overall proportion of damage apices in the subsequent analyses. Therefore, to explain the variation in the overall proportion of damaged apices we applied the ANOVA 1-way and linear regression, depending on the nature of the independent variable considered, if discrete (e.g. vegetation type or chemical compounds) or continuous (eg maximum relative humidity), respectively. The assumptions of all analyzes

(normality and homogeneity of variances) were verified through graphical inspection of the distribution of the response variable values (histogram) and residues of each test individually. No transformation was applied to the original data before analysis. All analyzes were performed in the computing environment R.

RESULTS

COLLETER DISTRIBUTION, MORPHOLOGY AND HISTOCHEMISTRY

We found that the examined colleters were associated with four morphological types of stipules: rounded, oval with bifurcate apices, fimbriate, and lanceolate. This information is summarized in Table 2.

Colleters varied in regard to distribution (Fig. 2, 3A-D) and number (Table 2) on the adaxial surface of the stipules. We observed four patterns of distribution of colleters: colleters distributed across the entire surface of the stipules - *Alibertia concolor* (Fig. 2A), *Alibertia sessilis* (Fig. 2B), *Coccocypselum* sp., and *Richardia grandiflora*, with a lower density occurring in the two latter species; colleters located within the concave region of the stipules occupying an area from the base to the apical region, in a triangular arrangement - *Guettarda viburnoides* (Fig. 2F, 3B), *Ixora gardneriana*, *Ixora heterodoxa* (Fig. 2D), *Palicourea rigida* (Fig. 2E), *Simira corumbensis*, *Tocoyena formosa*, and *Warszewiczia* sp.; colleters arranged in one or two longitudinal rows - *Coussarea hydrangaefolia*, *Randia* sp. (Fig. 2G), *Psychotria barbiflora*, *Psychotria marcgravii*, *Psychotria* sp., and *Palicourea* sp.; and isolated colleters found in the distal region of the stipules in *Palicourea* sp. (Fig. 3D). The number of colleters per stipule and size (height and width) of colleters ranged widely among the study species, independently of the vegetation type (Table 2).

In most species studied, colleters were accompanied by non-glandular trichomes (Fig. 3A-C, E). Non-glandular trichomes were scarce in *Alibertia concolor* (Fig. 3A), *Alibertia sessilis*, *Ixora gardneriana*, *Ixora heterodoxa*, *Psychotria barbiflora*, *Psychotria* sp. *Randia* sp. and abundant in *Coccocypselum* sp., *Guettarda viburnoides* (Fig. 3B), *Richardia grandiflora*, *Tocoyena formosa* (Fig. 3E), and *Warszewiczia* sp. (Fig. 3C). Non-glandular trichomes were lacking in *Palicourea* species, *Coussaria hydrangaefolia* and *Simira corumbensis*.

The colleter type and the presence and type of crystals were indicated for each examined species (Table 2). Standard colleters occurred in 14 of the 17 study species

(Table 2). Standard colleters exhibited a main body (Fig. 3E) and a constriction at the base (Fig. 3E, F), forming a peduncle. The main body has a smooth surface, which can have grooves on its distal portion (Fig. 3G). Dendroid colleters were recorded in *Alibertia concolor* and *Alibertia sessilis*, and lachrymiform colleters were exclusively found in *Coussarea hydrangaefolia* (Table 2). Calcium oxalate crystals in colleters were observed in 47% of the study species (Table 2). Crystals were predominantly type raphides occurring in clusters (Fig. 3H, I) except in *Palicourea rigida* that contain both prismatic crystals and raphides (Table 2).

Standard colleters were quite similar in histological organization. The main body has a sharp distinction between the secretory epithelium comprising palisade-arranged epidermal cells, and a central axis formed by axially elongated parenchyma cells (Fig. 4A-D). Standard colleters had considerable variation in height, width and number of both epithelial cells and central parenchyma cells (Fig. 4A, B, D). The peduncle can have variable size (Fig. 4A, B, D). Vascularization of the central axis was observed in *Palicourea rigida* colleters (Fig. 4E).

Lachrymiform colleters presented similar histological organization to standard colleters, being characterized by a pointed apex and a peduncle with wide base (Fig. 4F).

Dendroid colleters exhibited a central axis comprising axially arranged parenchyma cells surrounded by a secretory epithelium formed by conical, elongated epidermal cells with irregular sizes, only joined together at the base (Fig. 4G).

Colleters active in secretion were observed in the vegetative apex during the budding phase in species from both the forest and savanna. These colleters were turgid with a green-yellowish color and exhibited abundant secretions that varied from hyaline to milky, covering the entire vegetative apex (Fig. 2). In the first case, the colleters were initially green and smaller. Colleters inactive in secretion become brown and loose in aspect. In both cases, the changes in the colleters accompany the senescence process of the stipules, which may be deciduous or persist until the development of new apices.

Neutral polysaccharides, proteins, and pectic substances were histochemically detected in the epithelial cells of colleters in all of the species studied (Table 3). Already, lipids, alkaloids, phenolic compounds, and resins were detected in the epithelial cells of some species, with a prevalence of lipids and resins being observed in the species from the savanna (Table 3).

TEMPORAL VARIATION IN BUDDING AND IN THE PRESENCE OF EXUDATES IN THE VEGETATIVE APICES

The study species showed continuous budding with two peaks of greater intensity in forest, with approximately 40% of budding concentrated in the months of October and February (rainy season) (Figure 5A); while for the savanna species the distribution of this event was more homogeneous with a peak around 20% of budding in August (dry season) (Figure 5B).

Analyzing all species, regardless of the type of vegetation, 64% had budding peak at the end of the rainy season (February, March and April) and at the beginning of the dry season (May) (Table 4). During the dry period were recorded budding peaks in four species of forest *Alibertia concolor*, *Ixora heterodoxa*, *Richardia grandiflora* and *Warzewiczia* sp. and two species of savanna *Coccocypselum* sp. and *Tocoyena formosa* (Table 4).

During the budding period, in all study species, abundant secretion covering the vegetative apices was recorded. The exudate ranged from translucent to off-white as composed of mucilage or resin, respectively. At the initial stages of leaf development an exudate accumulation was detected inside the chamber formed by the stipules involving the vegetative apex. With the separation of stipules, the leaf primordia and young leaves were exposed and the exudate covering all the new leaf creates a translucent film on both surfaces. After the complete leaf expansion the exudate remains as isolated patches throughout the blade.

MICROCLIMATE AROUND THE STUDY PLANTS IN FOREST AND SAVANNA

In general, the relative humidity (maximum RH ($F_{(1,15)} = 0.03$; $p = 0.86$) and minimum RH ($F_{(1,15)} = 0.2$; $p = 0.68$)) around the plants studied did not differ between the two vegetation types (Fig. 6A). The maximum temperature did not differ between vegetation types ($F_{(1,15)} = 0.3$; $p = 0.59$). The minimum temperature ($F_{(1,15)} = 7.5$; $p = 0.01$) and the temperature amplitude ($F_{(1,15)} = 6.5$; $p = 0.02$) differed significantly between the two vegetation types (Fig. 6B). The temperature amplitude was 6-7°C higher in savanna than in forest (Fig. 6B). The maximum luminosity was the variable that most differ between the two vegetation types ($F_{(1,15)} = 41.4$; $p < 0.001$), and the savanna showed about 600% more light than forest (Fig. 6C). The minimum luminosity (values close to zero in both vegetation types) was on average higher in savanna ($F_{(1,15)} = 4.14$; $p = 0.06$).

PROPORTION OF SPECIES WITH LIPIDS, RESINS, PHENOLICS AND ALKALOIDS IN COLLETTERS FROM FOREST AND SAVANNA

The proportion of species with colletters containing lipids, resins, alkaloids, phenolic compounds differ between forest and savanna (Fig. 7). Lipids were present almost exclusively in savanna species, differing significantly of forest ($\chi^2 = 7.1$; $df = 1$, $p < 0.01$). The proportion of species with other compounds did not differ significantly between the two vegetation types (resin: $\chi^2 = 0.5$; $df = 1$; $p = 0.47$; phenols: $\chi^2 = 0.8$; $df = 1$; $p = 0.36$; alkaloids: $\chi^2 = 0$, $df = 1$, $p = 1$).

RELATIONSHIP AMONG THE PROPORTION OF DAMAGED APICES WITH THE VEGETATION TYPE, MICROCLIMATE VARIABLES AND COLLETTERS SECRETION

The proportion of damaged apices ranged from 0 to approximately 50% among the study species. In general, microclimate variables didn't explain the variation of damaged apices, including the minimum RH ($F_{(1,15)} = 0.03$, $p = 0.86$; $R^2 = 0.06$); maximum ($F_{(1,15)} = 2.52$, $p = 0.13$; $R^2 = 0.09$) and minimum temperature ($F_{(1,15)} = 0.36$, $p = 0.56$; $R^2 = 0.04$); and maximum ($F_{(1,15)} = 0.13$, $p = 0.72$; $R^2 = 0.06$) and minimum luminosity ($F_{(1,15)} = 0.40$, $p = 0.53$; $R^2 = 0.04$). However, the proportion of damaged apices showed a positive correlation with maximum RH (Fig. 8A; $F_{(1,15)} = 10.9$, $p = 0.005$; $R^2 = 0.38$), regardless of the vegetation type. This analyzes was repeated excluding the outlier detected in the upper right corner of the graph and the result remained the same (continuous line with the complete dataset, and dashed line without the outlier). On average, forest species had a higher proportion of damaged apices as compared to the savanna species (Fig 8B; $F_{(1,14)} = 4.7$, $p = 0.047$). Additionally, species that have lipids in colletters had, on average, a lower proportion of damaged apices (Fig. 8C; $F_{(1,14)} = 6.6$; $P = 0.02$). The species with the presence of the other compounds showed no significant differences in the proportion of damaged apices (Fig. 8D-F; resins: $F_{(1,14)} = 3.5$, $p = 0.08$; phenolic: $F_{(1,14)} = 0.35$; $p = 0.56$; alkaloids: $F_{(1,14)} = 0.91$; $p = 0.35$).

DISCUSSION

In this study, we compared 17 Rubiaceae species from savanna and forest focusing on colletters secretions, using an integrative approach combining morphological, histochemical and ecological evidences of the colleter's function.

First we detailed the morphological patterns of colleters and its arrangement (descriptive and quantitative variation of colleters). Additionally, we explored the differences between the microclimate around plants from savanna and forest, the proportion of damaged apices in both ecosystems and its correlation with colleters secretions. We also discussed the temporal variation of budding and presence of exudates on vegetative apices and its implication for the protective role of colleters in both ecosystems.

MORPHOLOGY AND ARRANGEMENT OF COLLETTERS IN RUBIACEAE SPECIES

The arrangement of colleters of the study species is associated with the morphological type of the stipule. Fimbriate and lanceolate stipules frequently exhibited colleters arranged in rows at the base of the stipules, whereas rounded and oval stipules with bifurcate apices had colleters either arranged across the entire surface or triangularly clustered. Interspecific variation in colleter arrangement was observed by Klein et al. (2004). The presence of non-glandular trichomes distributed among the colleters has been referred as common trait in Rubiaceae species (Lersten, 1974).

Among the 17 species investigated, 14 exhibited colleters of standard-type, except for *Coussarea hydrangaefolia*, which had lachrymiform type, and the two species of *Alibertia* genus that had dendroid colleters. As referred by Lersten (1974a, 1975), the standard type is most commonly found, with the dendroid colleters occurring in few Rubiaceae genera (Lersten, 1974a). Lachrymiform colleters are rarely described in Rubiaceae and this colleter type was referred for the first time in *Psychotria nuda* (Miguel et al., 2009).

Our results did not confirm the association of vascular supply with the great size of colleters, as previously described by Carlquist (1969), since the greatest colleters of *Ixora gardneriana* was not vascularized. Meantime, it is remarkable the reduced number of colleters in this species. Already, the colleters of *Palicourea rigida*, relatively minor, but in high number had vascularization. We hypothesize that the number of colleters, more than their size, is determinant to the vascularization supply, since this sink area requires a greater input of assimilates, which could be provided by vascular tissue connected to the parenchyma cells of the central axis, aiding in supplying precursors to synthesize the compounds present in the secretions,

similar to what occurs in some extrafloral nectaries (Fahn, 1979; Nicolson *et al.*, 2007).

The calcium oxalate crystals in colleters are one of the most important traits of the subfamily Rubioideae, due to the specificity of their shape and location in the colleters (Thomas, 1991). This report represents the first record of crystals for the subfamilies Ixoroideae and Cinchonoideae.

TEMPORAL VARIATION OF BUDDING AND OF EXUDATES PRESENCE IN VEGETATIVE APICES

Although the budding occurred during all the year, there were peaks in forest and savanna. In the forest, the two budding peaks coincide with the rainy season, while in savanna the apices are exposed in the dry season. This difference is remarkable and highlights the potential protective role of colleter secretion during the budding in the savanna species, protecting the apices against desiccation and high incidence of solar radiation. It must be emphasized that savanna had the highest values of luminosity around the studied plants. In savanna, the vegetative apices experience these intensified weather during budding peak, which occurs in the dry season when the most plants are leafless.

HISTOCHEMISTRY AND ECOLOGICAL ASPECTS OF COLLETTERS IN SAVANNA AND FOREST SPECIES

Mucilage, consisting of polysaccharides and proteins, was detected in all of the species independently of the vegetation type. These components of the secretion protect apices against desiccation and lubricate the meristems and young developing organs (Fahn, 1990; Thomas, 1991; Evert, 2006; Mayer *et al.*, 2013). The abundant secretion covering the apices as observed during the budding period reinforces the idea about these protective functions of colleters.

When comparing the species from the forest with savanna, we also observed marked differences between the environments with regard to the composition of secretions in the colleters, except for mucilage. Secretion predominantly hydrophilic was observed in forest, where 65% of the sampled species reacted positively also for alkaloids and phenolic substances. In this environment, a positive reaction for lipids and resin was detected in only 10% and 30% of the species, respectively. In the savanna, positive reactions also for lipids and resins were recorded in approximately

90% and 60% of the species, respectively. Lipophilic secretions, containing lipids and resins, which predominantly occurred in the savanna species, most likely confer greater protection on the vegetative apices against desiccation (Barreiro and Machado, 2007), caused by elevated temperatures and pronounced periods of drought, and against the high rates of radiation. According to Coutinho (2002), this climate conditions are common in Brazilian savanna, and our local microclimate measurements among plants also revealed the similar pattern. In this scenario, the high proportion of Rubiaceae species from savanna showing the apices covered with lipids and resins secretion produced by colleter could be considered as an evidence of its advantage, but additional experimental studies will be necessary to properly treat this issue.

Additional substances detected in the colleters of these Rubiaceae species may be acting together in the anti-herbivory protection of the vegetative apices, such as alkaloids (Trigo *et al.*, 2012), phenolic substances with organoleptic properties (Harborne, 2000), proteins due to entomotoxic properties (Mello and Silva-Filho, 2002), and crystals, especially those of calcium oxalate, which have been cited as a type of mechanical defense (Franceschi and Nakata, 2005).

Although we found characteristic patterns with regard to the composition of secretions for each environment, the chemical compounds, together with the colleter morphotype, appears to be phylogenetically correlated and conserved in some groups, as species of the same genus (*Alibertia* and *Psychotria*) in different environments presented similar pattern. The two species of *Alibertia* exhibited dendroid colleters and secretions composed of lipids, phenolic substances, and resins as well as polysaccharides and proteins in both environments. The *Psychotria* species found in the two environments displayed standard-type colleters and secretions composed of polysaccharides, alkaloids, phenolic compounds, and proteins. Similar results, though without environmental variation, were obtained for the genus *Simira*, as the standard-type colleters varied between the three species of the genus with regard to their distribution in the stipules and vascularization, but not with regard to the composition of secretions (Klein *et al.*, 2004), reinforcing the idea that this is a more phylogenetically conserved trait. In *Psychotria carthagenensis*, in the individuals occurring in tropical rain forests, on sandbanks, and in rheophytic environments, the colleters exhibited polysaccharide secretion, regardless of the environment (Vitarelli and Santos, 2009). In the present study, we identified

hydrophilic secretions in the colleters of different *Psychotria* species occurring in both environments, where the absence of lipids in species from savanna formations may be compensated by another trait that performs similar functions. We also consider that these traits could not have an actual role for particular plant species or clades, and its presence could be just the result of phylogenetic inertia from ancient functional roles, as suggested for the nectaries of *Anemopaegma* (Nogueira *et al.* 2012).

The higher proportion of damaged apices in forest, as compared to savanna, could be associated to the absence of lipids and resins in the colleters secretion of the most of the forest species. The alkaloids presence in the colleter secretion of some forest species may act against pathogens and herbivores due to its antioxidant and organoleptic properties (Mithöfer and Boland, 2012; Trigo *et al.*, 2012), corroborating the hypothesis of apices defense function assigned to colleters secretion (Thomas, 1991; Barreiro and Machado, 2007; Mayer *et al.* 2011).

CONCLUDING REMARKS

In synthesis we verified a prevalence of lipid and resin secretion associated with higher luminosity and lower proportion of damaged apices in savanna species. Distinctly, in forest ecosystem we verified an association among higher relative humidity and higher proportion of damaged apices and absence of lipids and resins in secretion. Alkaloids were slightly predominant in the secretion of forest species and could not be related with a protective role against herbivorous as forest species were less protected against apical damages. Our data reinforce the idea that colleters secretion has different patterns as comparing savanna with forest, suggesting alternative roles of these structures in each ecosystem, probably with a protective role avoiding dehydration and/or radiation of vegetative apices in savanna, while the role of these secretory structures in forest ecosystem appears unclear.

ACKNOWLEDGEMENTS

This article is part of the doctoral thesis of F. Tresmondi. Funding come from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2008/55434-7 and grant 2011/02488-5) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 473289/2010 and Grant to Machado, S.R.). We thanks to Yve Canaveze for help in the preparation of figures and text revision, Danilo Silva for

suggestion on statistical analysis, and the staff of ‘Centro de Microscopia Eletrônica (IBB, UNESP)’ for SEM assistance.

REFERENCES

- Agostinelli C, Lund U. 2011.** R package ‘circular’: Circular Statistics (version 0.4–3). R-project website Available: <https://r-forge.r-project.org/projects/circular/>. Accessed 2014 Sep 23.
- Barreiro DP, Machado SR. 2007.** Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. *Revista Brasileira de Botânica* **30**: 387–399.
- Batschelet E. 1981.** Circular Statistics in Biology. Academic Press, New York.
- Carlquist S. 1969.** Toward acceptable evolutionary interpretations of floral anatomy. *Phytomorphology* **19**: 332–362.
- Cortelazzo AL. 1992.** Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. *Revista Brasileira de Botânica* **15**:157–62.
- Coutinho, L.M. 1978.** O conceito de cerrado. *Rev. Bras. Bot.* **1**(1):17-23.
- Coutinho LM. 2002.** O bioma do cerrado. In: Klein AL, ed. *Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois*. São Paulo: Editora da Unesp,77-91.
- Cunha, AR, Martins, D. 2009.** Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel-SP. *Irriga*: **14** (1): 1-11.
- Delprete PG, Jardim JG. 2012.** Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenge. *Rodriguésia* **63**: 101–128.
- Evert RF. 2006.** *Esau’s plant anatomy, meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. 3th edn. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Fahn A. 1990.** *Plant anatomy*. Oxford: Pergamon Press.
- Fournier, LA. 1974.** Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. *Turrialba* **24**:422-423.
- Franceschi, VR; Nakata, P A. 2005.** *Calcium oxalate in plants: Formation and Function*. *Annual Review of Plant Biology* **56**:41-71.

- Harborne JB, Baxter H, Moss GP. 1999.** *Phytochemical Dictionary: A Handbook of bioactive compounds from plants*. 2th edn. London: Taylor and Francis.
- Jammalamadaka, SR; SenGupta, A. 2001.** Topics in Circular Statistics, World Scientific, New York.
- Jensen WA. 1962.** *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco: W. H. Freeman and Co.
- Johansen D.A. 1940.** *Plant microtechnique*. New York: Paul B. Hoeber, Inc.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137A–138.
- Klein DE, Gomes VM, Silva-Neto SJ, Cunha M. 2004.** The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany* 94: 733–740.
- Kronstedt-Robards E; Robards A. 1991.** Exocytosis in gland cells. In Endocytosis, exocytosis and vesicle traffic in plants (C. Hawea, J. Coleman & D. Evans, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, p.199-232.
- Lersten NR 1974.** Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodules in *Psychotria* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 61: 973–981.
- Lersten NR. 1975.** Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 71: 311–319.
- Mayer JMS, Cardoso-Gustavson P, Appezzato-da-Gloria B. 2011.** Colleters in monocots: New record for Orchidaceae. *Flora* 206: 185–190.
- Mayer JMS, Carmello-Guerreiro SM, Mazzafera P. 2013.** A functional role for the colleters of coffee flowers. *Annals of Botany* 5: plt029. doi:10.1093/aobpla/plt029.
- Mazia D, Brewer PA, Alfert M. 1953.** The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *The Biological Bulletin* 104: 57–67.
- Melo MO, Silva-Filho MC. 2002.** Plant-insect interaction: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 14:71–81.
- Miguel EC, Moraes DG, Da Cunha M. 2009.** Stipular colleters in *Psychotria nuda* (Cham. e Schltdl.) Wawra (Rubiaceae): micromorphology, anatomy and cristals microanalysis. *Acta Botanica Brasilica* 23: 1034–1039.
- Mithöfer A, Boland W. 2012.** Plant defense against herbivores: Chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology* 63: 431-450.

- Nicolson, SW; Nepi, M; Pacini, W. 2007.** Nectaries and nectar. Springer-Verlag, Dordrecht, The Netherlands.
- Nogueira A, Guimarães E; Machado SR; Lohmann LG. 2012.** Do extrafloral nectaries present a defensive role against herbivores in two species of the family Bignoniaceae in a Neotropical savannas? *Plant Ecology* (Dordrecht), v. 213, p. 289-301.
- Pearse AGE. 1980.** *Histochemistry, theoretical and applied: preparative and optical technology*. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Pizzolato TD, Lillie RD. 1973.** Mayer's tannicacid-ferric chloride stain for mucins. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **21**: 56–64.
- Robards AW. 1978.** An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: Hall JL, ed. *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. New York: Elsevier, 343–403.
- Robbrecht E. 1988.** Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. *Opera Botanica Belgica* **1**: 1–271.
- Souza VC, Lorenzi H. 2005.** *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Svendsen AB, Verpoorte R. 1983.** *Cromatography of alkaloids*. New York: Elsevier Scientific Publishing Company.
- Thomas V. 1991.** Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany* **68**: 287–305.
- Trigo JR, Pareja M, Massuda KF. 2012.** O papel das substâncias químicas nas interações entre plantas e insetos herbívoros. In: Del-Claro K, Torezan-Silingardi HM, eds. *Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutivo*. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 67–88.
- Vitarelli NC, Santos M. 2009.** Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria cartagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasílica* **23**: 923–928.
- Walter, H.; Lieth, H. 1967.** Klimadiagramm-Weltatlas. Jena: Pustl. Gustav Fischer.
- Zar JH. 2010.** *Biostatistical Analysis*. 5th edition. Prentice Hall. 944pp.

Tables and Figures

Table 1. List of the studied subfamilies and species of Rubiaceae and their respective habits (arb: arboreal, herb: herbaceous, shr: shrub), vegetation types (forest and savanna) and record numbers in the BOTU herbarium, in central-western São Paulo State, Brazil.

| Subfamily | Species | Habit | Vegetation type | BOTU record |
|---------------|--|-------|-----------------|-------------|
| Anthireoideae | <i>Guettarda viburnoides</i> Cham. & Schltdl. | arb | savanna | 28482 |
| Cinchonoideae | <i>Coccocypselum</i> sp. P. Browne | herb | savanna | 28502 |
| | <i>Warzewiczia</i> Klotzsch. | shr | forest | 28513 |
| Ixoroideae | <i>Alibertia concolor</i> (Cham.) K. Schum. | shr | forest | 28483 |
| | <i>Alibertia sessilis</i> (Vell.) K.Schum. | shr | savanna | 28505 |
| | <i>Ixora gardneriana</i> Benth. | arb | forest | 28488 |
| | <i>Ixora heterodoxa</i> Müll. Arg. | arb | forest | 28492 |
| | <i>Tocoyena formosa</i> Cham. & Schltdl. | arb | savanna | 28506 |
| Rubioideae | <i>Coussarea hydrangaefolia</i> (Benth.) Benth. & Hook.f. ex Müll.Arg. | arb | savanna | 28499 |
| | <i>Palicourea rigida</i> Kunth. | shr | savanna | 28484 |
| | <i>Palicourea</i> sp. Aubl. | shr | savanna | 28514 |
| | <i>Psychotria barbiflora</i> DC. | shr | forest | 28477 |
| | <i>Psychotria marcgravii</i> (A.St.-Hil.) Spreng. | shr | forest | 28501 |
| | <i>Psychotria</i> sp. L. | shr | savanna | 28512 |
| | <i>Randia</i> sp. L. | shr | forest | 28511 |
| | <i>Richardia grandiflora</i> (Cham. & Schltdl.) | herb | forest | 28476 |
| | <i>Simira corumbensis</i> (Standl.) Steyerm. | arb | forest | 28490 |

Table 2. Stipule morphology, pattern of colleter distribution in stipules, quantitative data for the colletes, colleter types, crystal types in Rubiaceae species from forest and savanna in central-western São Paulo State, Brazil. (n.o. = not observed; ra = raphides; pr = prismatic).

| Vegetation | Species | Stipule morphology | Distribution of colletes in adaxial surface stipule | Colletes per stipule (mean and standard error) | Size (μm^2) | | Colleter type | Crystals |
|------------|---------------------------------|----------------------------|--|--|--------------------------|-------|---------------|----------|
| | | | | | height | width | | |
| forest | <i>Alibertia concolor</i> | rounded | entire surface | 95.8 ± 2.43 | 60 | 30 | Dendroid | n.o. |
| | <i>Ixora gardneriana</i> | rounded | triangular arrangement | 8.8 ± 1.08 | 1805 | 230 | Standard | ra |
| | <i>Ixora heterodoxa</i> | rounded | triangular arrangement | 33.4 ± 1.73 | 440 | 110 | Standard | ra |
| | <i>Psychotria marcgravii</i> | oval with bifurcate apices | one or two longitudinal rows | 33.4 ± 2.01 | 590 | 115 | Standard | ra |
| | <i>Psychotria barbiflora</i> | oval with bifurcate apices | one or two longitudinal rows | 37.2 ± 1.99 | 480 | 160 | Standard | ra |
| | <i>Randia</i> sp. | rounded | one or two longitudinal rows | 9.2 ± 0.87 | 160 | 60 | Standard | n.o. |
| | <i>Richardia grandiflora</i> | fimbriate | entire surface | 4.6 ± 0.7 | 190 | 50 | Standard | n.o. |
| | <i>Simira corumbensis</i> | rounded | triangular arrangement | 214.4 ± 5.03 | 415 | 85 | Standard | n.o. |
| | <i>Warzewickzia</i> sp. | lanceolate | triangular arrangement | 35.8 ± 2.30 | 550 | 30 | Standard | n.o. |
| savanna | <i>Alibertia sessilis</i> | rounded | entire surface | 74.6 ± 2.09 | 450 | 150 | Dendroid | n.o. |
| | <i>Coccocypselum</i> sp. | rounded | entire surface | 4.8 ± 0.63 | 340 | 60 | Standard | n.o. |
| | <i>Coussarea hydrangaefolia</i> | lanceolate | one or two longitudinal rows | 27 ± 1.29 | 1360 | 215 | Lachrymiform | ra |
| | <i>Guettarda viburnoides</i> | rounded | triangular arrangement | 24.6 ± 1.55 | 588 | 295 | Standard | n.o. |
| | <i>Palicourea</i> sp. | lanceolate | one or two longitudinal rows and single in distal region | 12.6 ± 1.47 | 543 | 80 | Standard | ra |
| | <i>Palicourea rigida</i> | lanceolate | triangular arrangement | 337 ± 2.90 | 1600 | 170 | Standard | ra/pr |
| | <i>Psychotria</i> sp. | oval with bifurcate apices | one or two longitudinal rows | 35.6 ± 2.38 | 535 | 45 | Standard | ra |
| | <i>Tocoyena formosa</i> | rounded | triangular arrangement | 46.6 ± 1.77 | 450 | 165 | Standard | n.o. |

Table 3. Main classes of compounds present in the secretory epithelium of the colleters of 17 Rubiaceae species from forest and savanna in central-western São Paulo State, Brazil. (+: presence; -: absence)

| Vegetation | Species | Lipids | Alkaloids | Phenolic substances | Resin |
|------------|---------------------------------|--------|-----------|---------------------|-------|
| forest | <i>Alibertia concolor</i> | + | - | + | + |
| | <i>Ixora gardneriana</i> | - | - | - | + |
| | <i>Ixora heterodoxa</i> | - | - | - | + |
| | <i>Psychotria barbiflora</i> | - | + | + | - |
| | <i>Psychotria marcgravii</i> | - | + | + | - |
| | <i>Randia</i> sp. | - | + | + | - |
| | <i>Richardia grandiflora</i> | - | + | - | - |
| | <i>Simira corumbensis</i> | - | + | + | - |
| | <i>Warzewickzia</i> sp. | - | - | - | - |
| savanna | <i>Alibertia sessilis</i> | + | - | + | + |
| | <i>Coccocypselum</i> sp. | + | - | + | - |
| | <i>Coussarea hydrangaefolia</i> | + | + | + | + |
| | <i>Guettarda viburnoides</i> | + | - | - | + |
| | <i>Palicourea</i> sp. | + | + | + | + |
| | <i>Palicourea rigida</i> | + | - | + | + |
| | <i>Psychotria</i> sp. | - | + | + | - |
| | <i>Tocoyena formosa</i> | + | + | + | - |

Table 4. Descriptive circular statistics for budding period of Rubiaceae species from forest and savanna in the central-western of São Paulo state, Brazil. All tests were significant ($p < 0.05$).

| Species | Median (1° e 3° quartiles) | Budding peak | r | Kuiper test | Watson test |
|---------------------------------|----------------------------------|------------------|-------|-------------|-------------|
| Forest | | | | | |
| <i>Alibertia concolor</i> | 337.52 (278.70-19.60) | Set | 0.634 | 101.40 | 14.624 |
| <i>Ixora gardneriana</i> | 139 (78.38 – 309.13) | Mai | 0.281 | 35.58 | 0.575 |
| <i>Ixora heterodoxa</i> | 168.56 (78.38-248.33) | Ago | 0.302 | 77.74 | 1.207 |
| <i>Psychotria marcgravii</i> | 49.98 (367.90-78.38) | Fev-Abr | 0.479 | 63.12 | 0.907 |
| <i>Psychotria barbiflora</i> | 309.13 (309.13-337.52) | Out | 0.758 | 83.97 | 29.629 |
| <i>Randia sp.</i> | 93.56 (49.98-139) | Fev-Mai | 0.511 | 82.31 | 0.673 |
| <i>Richardia grandiflora</i> | 248.33 (139-248.33) | Mai, Ago | 0.537 | 4.64 | 1.747 |
| <i>Simira corumbensis</i> | 49 (19.60-78.38) | Jan, Mar | 0.871 | 39.16 | 0.584 |
| <i>Warzewickzia sp.</i> | 278.70 (218.94-367.90) | Ago, Nov | 0.226 | 55.64 | 0.557 |
| Savanna | | | | | |
| <i>Alibertia sessilis</i> | 278.70 (168.56 – 309.13) | Fev, Mai, Out | 0.117 | 66.85 | 15.256 |
| <i>Coccocypselum sp.</i> | 248.33 (108.80-248.33) | Ago | 0.191 | 61.08 | 18.094 |
| <i>Coussarea hydrangaefolia</i> | 399.60 (19.60-49.98) | Jan-Fev | 0.920 | 75.07 | 13.639 |
| <i>Guettarda viburnoides</i> | 337.52 (309.13-19.6) | Out | 0.508 | 76.57 | 14.793 |
| <i>Palicourea rigida</i> | 323.31 (309.13-367.90) | Out | 0.700 | 82.37 | 0.775 |
| <i>Palicourea sp.</i> | 49.98 (367.90-78.38) | Fev-Mar | 0.554 | 74.48 | 0.829 |
| <i>Psychotria sp.</i> | 19.60 (309.13-49.98) | Fev | 0.353 | 57.65 | 1.234 |
| <i>Tocoyena formosa</i> | 49.98 (278.70-49.98) | Fev, Set | 0.483 | 43.65 | 11.631 |

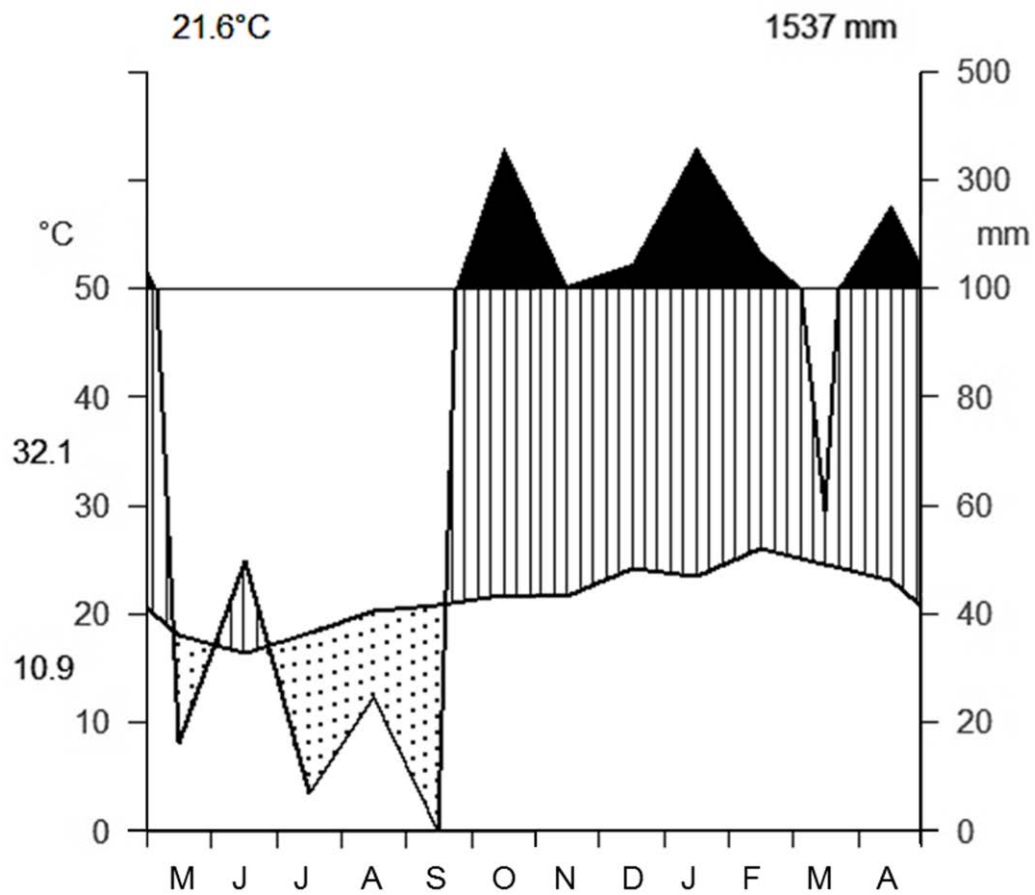


Figure 1. Climate diagram for Botucatu region, central-western São Paulo state, Brazil. Dotted area corresponds to dry period (May-Sep), stripes and black areas correspond to wet period (Oct-Apr).

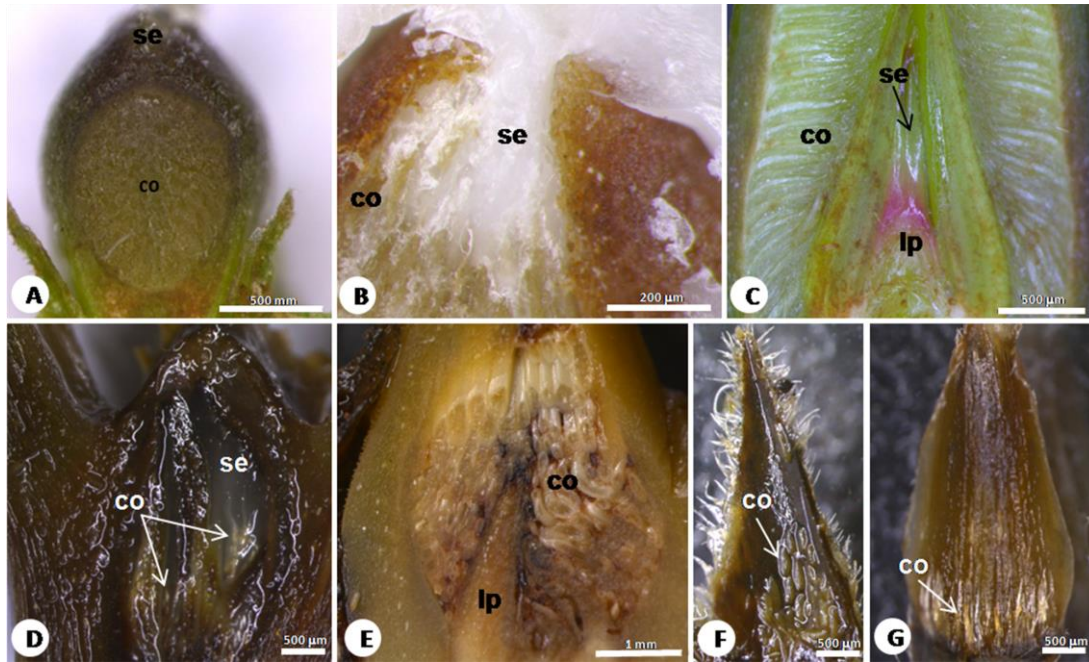


Figure 2. Exudates and distribution of colleters on the adaxial surface of the stipules in vegetative apices of Rubiaceae species. **A-E.** Longitudinal sections of apices. **F-G.** Adaxial surface of stipules. **A-B.** Resinous secretions (se) covering the vegetative apices in *Alibertia concolor* (A), *Alibertia sessilis* (B). **C.** Hydrophilic secretion (se) covering the apex and leaf primordium (lp) in *Simira corumbensis*. **D.** Resinous secretions (se) covering the vegetative apex of *Ixora heterodoxa*. **E.** Numerous colleters (co) projecting itself onto other colleters and leaf primordium (lp) in *Palicourea rigida*. **F.** Colleters (co) arranged triangularly in the concave portion of the stipules in *Guettarda viburnoides*. **G.** Colleters (co) arranged in longitudinal rows in *Randia* sp.. co. Colleters. se. Secretion. lp. Leaf primordium.

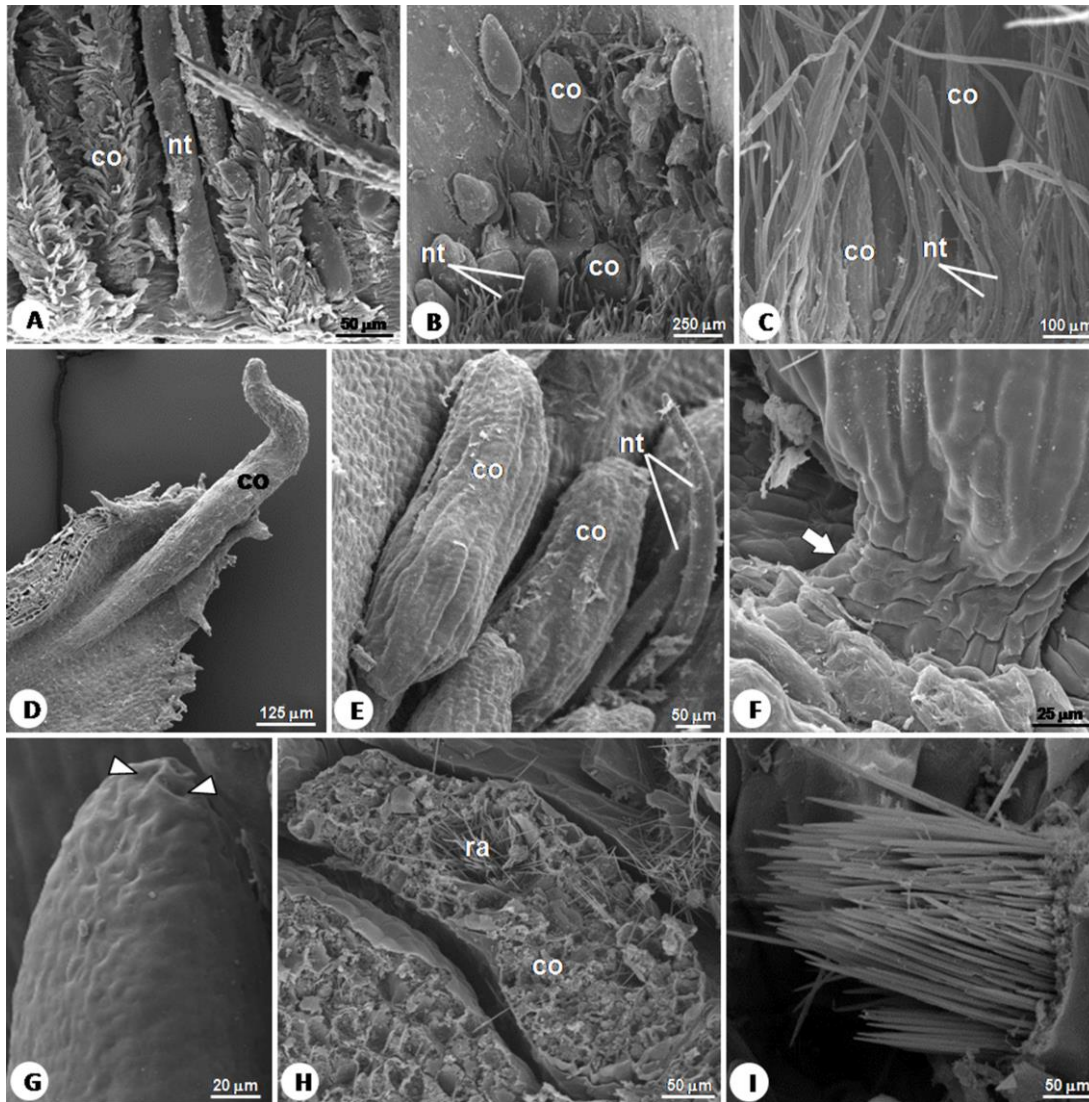


Figure 3. Distribution and morphology of colleters in Rubiaceae species under scanning electron microscope. **A.** Dendroid colleters (co) between massive non-glandular trichomes (nt) in *Alibertia concolor*. **B-C.** Standard colleters (co) between non-glandular trichomes (nt) in *Guettarda viburnoides* (B) and *Warszewiczia sp.* (C). **D.** Single standard colleter (co) in the distal region of the adaxial surface of the stipule in *Palicourea sp.* **E-G.** Standard colleters in *Tocoyena formosa*. **E.** General aspect. **F.** Proximal region of the colleter showing peduncle (arrow). **G.** Grooves in surface (arrowhead) on the distal region of the colleter. **H-I.** Standard colleters in *Psychotria marcgravii*. **H.** Idioblasts containing raphides in the parenchyma axis. **I.** Detail of the cluster of raphides (ra). co. Colleter. nt. Non-glandular trichome. ra. Raphides.

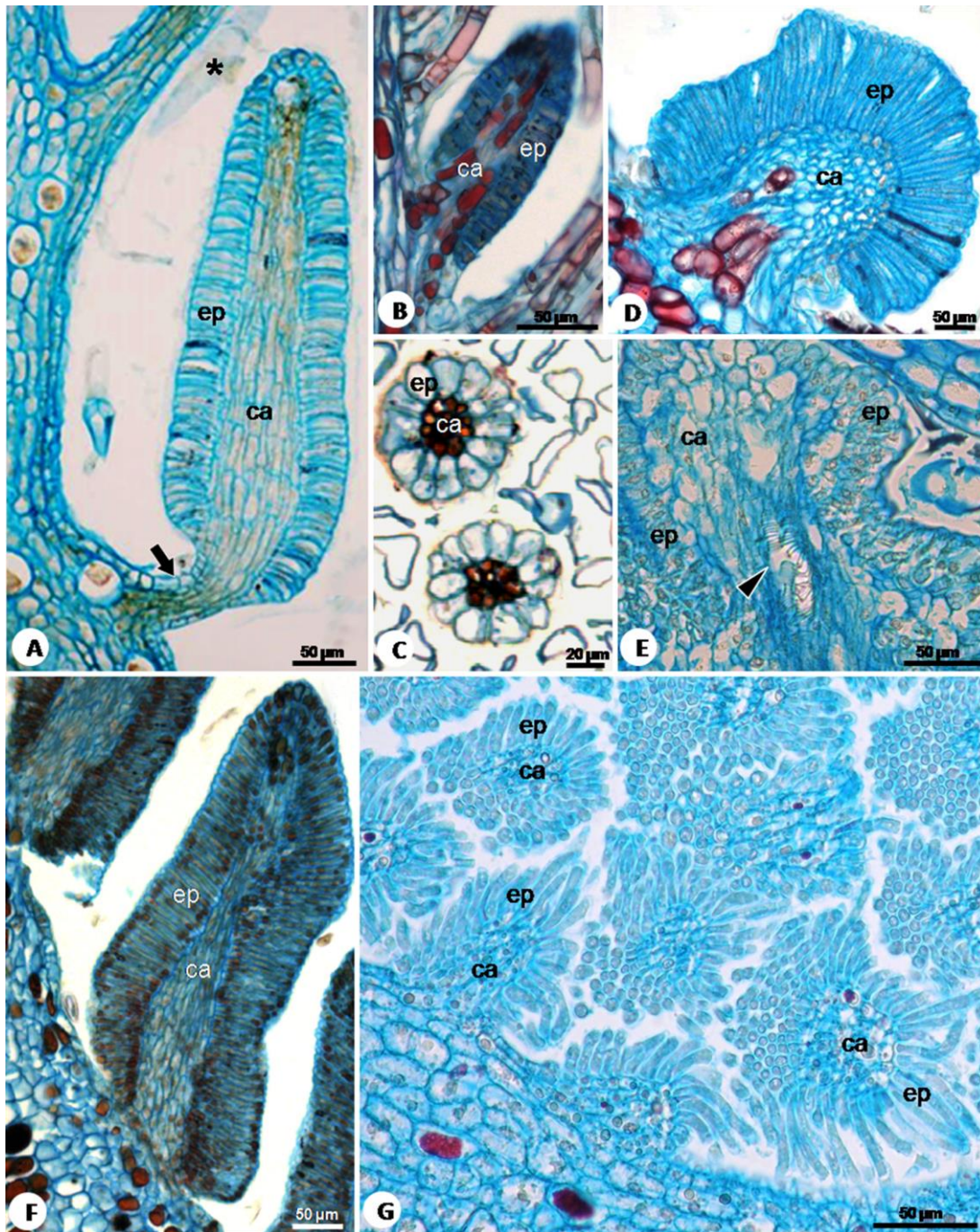


Figure 4. Colleter types of Rubiaceae species. **A-E.** Standard colleters. **A.** *Tocoyena formosa*, observe the central axis (ca) surrounded by epidermal cells (ep), peduncle (arrow) and exudates (asterisk) of colleter. **B-C.** *Ixora heterodoxa*. **D.** *Guettarda viburnoides*. **E.** *Palicourea rigida*, note vascular elements (arrowhead) in central axis (ca). **F.** Lachrymiform colleter in *Coussarea hydrangaefolia*, note pointed apex and a peduncle with wide base. **G.** Dendroid colleters in *Alibertia concolor*, observe that the epidermal cells (ep) showed irregular sizes and they were joined together only at the base. A, B, D-G. Longitudinal sections. C. Transverse section. ca. Central axis. ep. Epidermal cells.

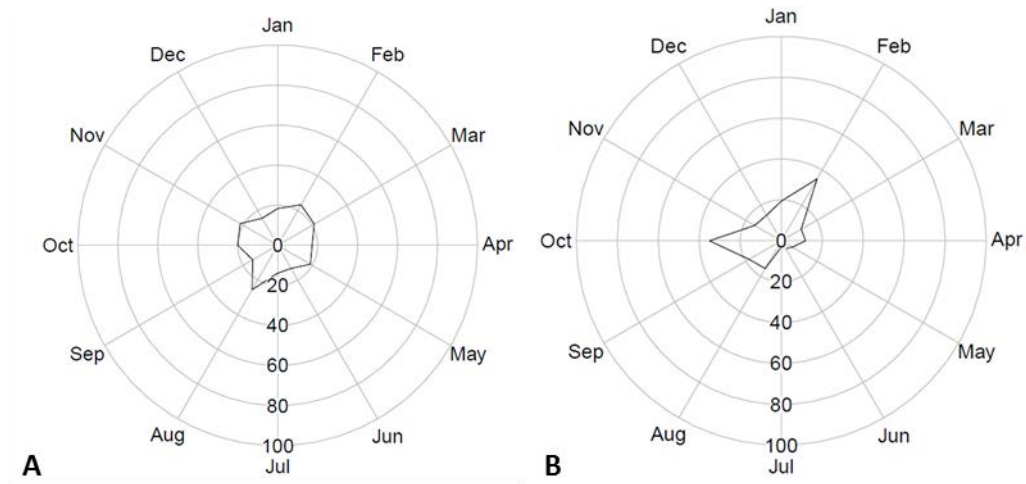


Figure 5. Circular histogram of the monthly relative frequency of budding Rubiaceae species in (A) forest and (B) savanna located in the central-western of São Paulo state, Brazil.

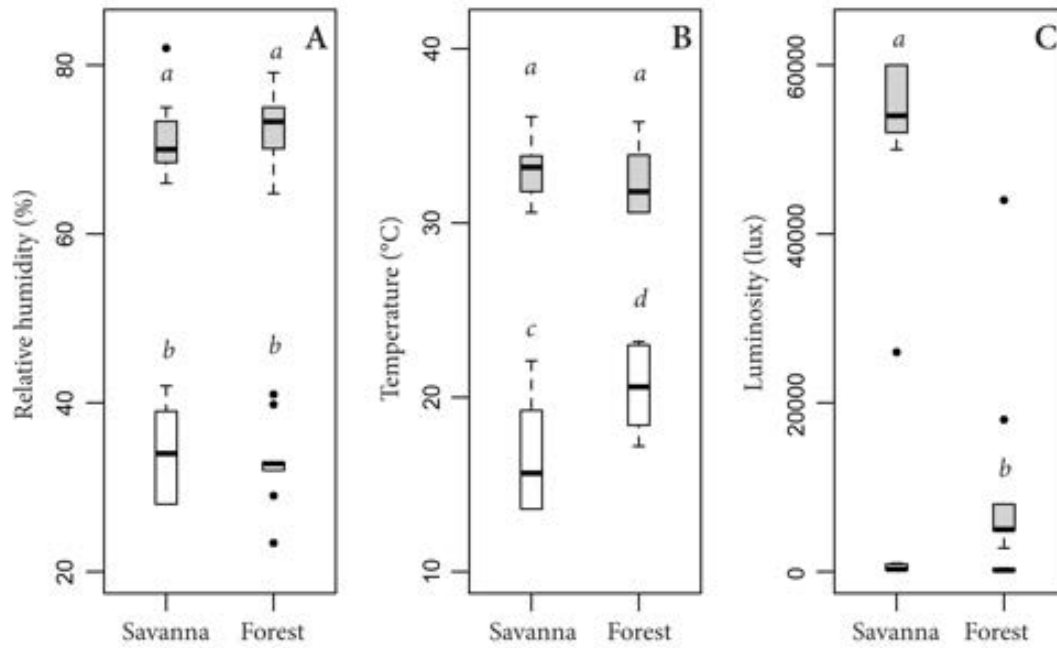


Figure 6. Variation in microclimate (maximum and minimum) nearby Rubiaceae plants in forest and savanna. In each graph, the maximum values appeared in gray, and minimum values in white. Different letters indicates statistically significant difference between the forest and savanna microclimate ($p \leq 0.05$).

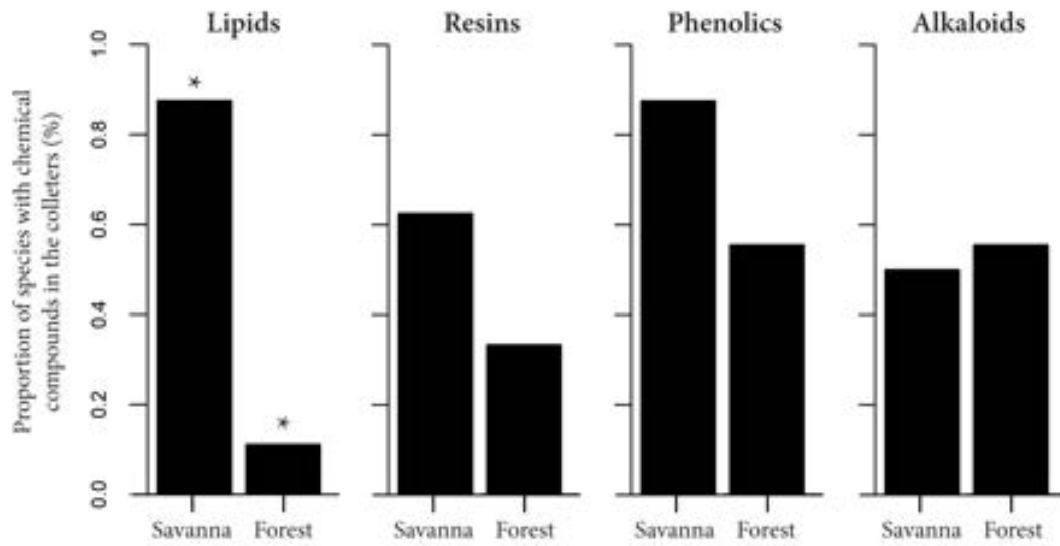


Figure 7. Proportion of Rubiaceae species with collectors containing lipids, resins, phenolics and alkaloids in forest and savanna in the central-western of São Paulo state, Brazil. Asterisk indicates statistically significant difference ($p \leq 0.05$).

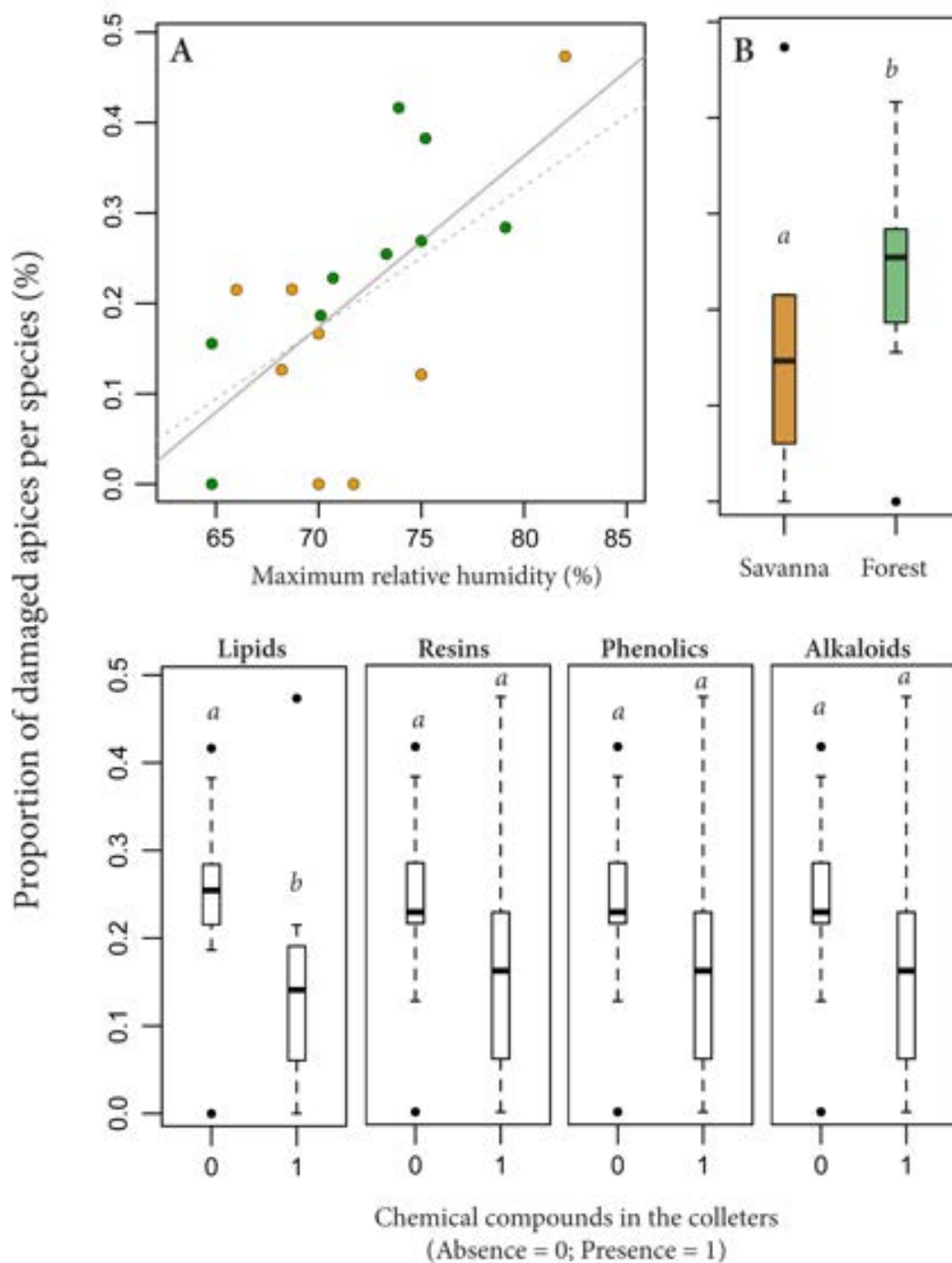


Figure 8. Variation in the proportion of damaged apices in relation to the relative humidity (A) (without outlier is represented with dotted line), vegetation type (B) and chemical compounds in colleters (C-F) in Rubiaceae species from forest and savanna in central-western of São Paulo state, Brazil. Different letters indicate statistically significant difference ($p \leq 0.05$).

Capítulo II

Capítulo II

Elaborado segundo as normas do periódico *International Journal of Plant Sciences*

Caracterização subcelular e ultracitoquímica de coléteres padrão em espécies de Rubiaceae

Resumo

Neste trabalho, investigamos a organização subcelular de coléteres padrão em oito espécies de Rubiaceae, com secreção de natureza distinta, buscando elucidar a ultraestrutura das células epiteliais e aspectos do processo secretor, especialmente aqueles relacionados aos sítios de acúmulo da secreção e mecanismos de liberação do exsudato. Para isso, amostras de estípulas contendo coléteres ativos em secreção foram coletadas e processadas para análises convencionais e citoquímicas em microscopia eletrônica de transmissão. Foram usados os métodos do ZIO para marcação do sistema de endomembranas, ósmio-imidazol para lipídios insaturados e Thiéry para polissacarídeos. Abundância de dictiossomos hiperativos dispersos pelo citoplasma das células epiteliais em associação com elementos tubulares do retículo endoplasmático rugoso, plastídios polimórficos contendo inclusões protéicas e imagens sugestivas de exocitose foram as principais características de coléteres com secreção hidrofílica. Já, dictiossomos bem desenvolvidos e retículo endoplasmático rugoso extensivo com distribuição polarizada nas células epiteliais, plastídios com inclusões lipídicas e corpos lipídicos dispersos no citoplasma e espaços intercelulares entremeados com polissacarídeos caracterizaram os coléteres com secreção mista. Dictiossomos escassos, abundância de elementos de retículo endoplasmático liso, isolados ou anastomosados, e abundância de material lipofílico com elétron-densidade variável dispersos no citoplasma, em espaços intercelulares e “bolsas” de acúmulo de secreção nas paredes periclinais foram características de coléteres com secreção predominantemente lipofílica. As análises convencionais combinadas com citoquímica ultraestrutural permitiram identificar alterações importantes na parede periclinal externa das células epiteliais, especialmente na camada basal, podendo se estender para a camada fibrosa e estrato cuticular, formando sítios de acúmulo de secreção. Mesmo com a desestruturação atingindo parte do estrato cuticular, a cutícula propriamente dita se manteve intacta. Esses resultados comprovam a participação da parede periclinal externa no acúmulo temporário e a liberação da secreção. Nossos resultados mostraram que coléteres morfológicamente semelhantes possuem particularidades subcelulares associadas com a natureza da secreção. Contudo, aspectos relacionados com a compartimentalização e eliminação da secreção foram compartilhados pelos coléteres de todas as espécies estudadas.

Introdução

Coléteres são emergências glandulares caracterizadas pela produção de fluido mucilaginoso, composto predominantemente por polissacarídeos e proteínas, ou resinoso e insolúvel em água, que permeia e cobre os meristemas apicais e estruturas jovens em desenvolvimento (Fahn 1979; Evert 2006, 2013).

Com base na morfologia, diversos tipos de coléteres foram descritos em Rubiaceae, sendo o tipo mais comum designado tipo padrão (Thomas 1991; Evert 2006, 2013). Coléteres padrão consistem de um eixo central parequimático e multisseriado revestido por epiderme com células dispostas em paliçada, especializadas em secreção, denominadas células epiteliais (Lersten 1974). Em nível subcelular, as células epiteliais de coléteres padrão são caracterizadas por possuírem dictiossomas e mitocôndrias em abundância e extenso sistema de retículo endoplasmático (Klein et al. 2004; Miguel et al. 2010). Vias granulócrica e écrina têm sido referidas como os mecanismos de liberação da secreção a partir do protoplasto das células epiteliais (Fahn 1979, Roshchina & Roshchina 1993, Evert 2006, 2013). Uma vez fora do protoplasto, as substâncias atravessam as paredes celulares e alcançam o meio extracelular, sendo então, eliminadas para a superfície da glândula, aparentemente devido à pressão de turgor do protoplasto sobre as paredes da célula secretora (Fahn 1979). Variações consideráveis nos mecanismos de liberação da secreção têm sido descritas em coléteres de diferentes espécies de Rubiaceae, incluindo a desestruturação de paredes celulares e da cutícula (Miguel et al. 2010, Machado et al. 2012). É importante registrar que a maioria dos estudos ultraestruturais sobre coléteres de Rubiaceae se refere àqueles com secreção de natureza mucilaginosa. Estudos ultraestruturais comparando coléteres com secreção de natureza distinta são escassos, merecendo destaque o trabalho de Machado et al. (2012) que descreveram coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) focando nos aspectos subcelulares e mecanismos de secreção.

Estudando coléteres padrão em diferentes espécies de Rubiaceae verificamos variações interespecíficas relacionadas à natureza da secreção, com espécies apresentando secreção hidrofílica (mucilagem, alcalóides e fenólicos), outras secreção mista (mucilagem, fenólicos e lipídios) e, ainda, outras, secreção predominantemente lipofílica (mucilagem, lipídios e resinas) (Tresmondi et al. *under review*). Neste trabalho, investigamos a organização subcelular de coléteres padrão em espécies de Rubiaceae, com secreção de natureza distinta, buscando elucidar a

ultraestrutura das células epiteliais e aspectos do processo secretor, especialmente aqueles relacionados aos sítios de acúmulo da secreção e mecanismos de liberação do exsudato.

Material e métodos

Foram estudados coléteres estipulares de oito espécies de Rubiaceae (Tabela 1) ocorrendo em formações savânicas de cerrado e floresta estacional semidecídua localizadas no centro-oeste do estado de São Paulo (48°20' to 48°50'W; 22°40' to 23°05'S).

Amostras de estípulas contendo coléteres ativos em secreção, caracterizados pelo aspecto intumescido, coloração pálea a amarelada e com fluido visível na superfície, foram fixadas para estudos convencionais e citoquímicos em microscopia eletrônica de transmissão. Vouchers foram depositados no Herbário BOTU do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP - Univ. Estadual Paulista (Tabela 1).

Análises convencionais

Para a caracterização da organização subcelular das células epiteliais, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, tampão fosfato 0,1M pH 7,3 por 12 horas a temperatura ambiente e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão. A seguir, foram desidratadas em série cetônica e embebidas em resina Araldite. A polimerização foi realizada em estufa a 60°C durante 48h. Os cortes semifinos (0,5µm) foram contrastados com mistura de Azul de metileno 1% e Azul II 1% em solução de bórax 1%. Os cortes ultrafinos (80nm) foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds 1963). O material foi analisado e documentado ao microscópio eletrônico de transmissão TEM Tecnai Spirit (FEI) a 60 kv.

Citoquímica Ultraestrutural

Marcação do sistema de endomembranas

Para melhor caracterização da população de organelas das células secretoras, foi utilizada a técnica do ZIO para marcação do sistema de endomembranas. Para isso, as amostras foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 4,0 % em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, e incubadas por 22 horas a

10°C em solução contendo Zn, I, TRIS-aminometano e tetróxido de Ósmio 1,0 % (Reinecke & Walther 1978). A seguir, o material foi processado segundo técnica convencional e examinado ao microscópio eletrônico de transmissão TEM Tecnai Spirit (FEI) a 60 kv.

Detecção de lipídios insaturados

Para marcação de lipídios insaturados, foi utilizada a técnica de Ósmio-Imidazol (Angermüller & Fahimi 1982). Para isso, as amostras foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 2,5 %, formaldeído 4,0 % diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, em temperatura ambiente, durante 24 horas. Posteriormente, o material foi imerso em tampão imidazol 0,05 M, pH 7,2, em temperatura ambiente, durante 24 horas. A seguir, foi pós-fixado em solução aquosa de tetróxido de Ósmio 1,0 % e tampão imidazol 0,05 M, por 72 horas no escuro. Então, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e, posteriormente, em tampão cacodilato de sódio 0,05 M e processadas segundo técnica convencional. No material controle, o tampão imidazol 0,05 M foi substituído por tampão cacodilato de sódio 0,05M. As amostras foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão TEM Tecnai Spirit (FEI) a 60 kv.

Detecção de carboidratos

Para detecção de carboidratos foi empregado o método de Thiéry (1967), utilizando-se tiosemicarbazida-proteinato de prata (PATAg). Para isso, cortes ultrafinos das amostras processadas convencionalmente para microscopia eletrônica de transmissão foram coletados em grades de ouro de 300 mesh e tratados com solução aquosa de ácido periódico 1%, durante 30 minutos. Após lavagem em água destilada, as grades foram imersas em gotas de solução aquosa de tiosemicarbazida 1% contendo ácido acético a10%, durante 72 horas. A seguir, essas amostras passaram por uma série decrescente de ácido acético (10%, 5%, 2 % em água destilada). Após isso, os cortes ultrafinos foram imersos em solução aquosa de proteinato de prata 1%, durante 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro, seguindo-se lavagem em água destilada. O controle foi realizado pela exclusão do tratamento com solução aquosa de ácido periódico. As amostras foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão TEM Tecnai Spirit (FEI) a 60 kv.

Resultados

Para a descrição da organização subcelular e da citoquímica das células epiteliais, os coléteres foram agrupados segundo a natureza predominante da secreção previamente investigada por Tresmondi et al. (*under review*).

Secreção hidrofílica (mucilagem, alcalóides e fenólicos)

As células epiteliais dos coléteres de *Psychotria barbiflora*, *Simira corumbensis* e *Warzewickzia* sp., apresentam parede periclinal externa elétron-densa coberta com cutícula irregularmente espessada, núcleo volumoso, citoplasma denso com abundância de organelas e vacuoma pouco desenvolvido (Fig. 1A). O núcleo de contorno lobado apresenta nucléolo compacto e clara distinção entre eucromatina e heterocromatina (Fig. 1B). O citoplasma possui abundância de ribossomos livres, mitocôndrias, dictiossomos, vesículas, elementos de retículo endoplasmático rugoso (RER) e poucos plastídios (Fig. 1A, C). Mitocôndrias ocorrem agrupadas ao redor do núcleo (Fig. 1B) e também dispersas por todo o citoplasma (Fig. 1C), são alongadas, possuem matriz densa e cristas dilatadas. Os dictiossomos são bem desenvolvidos e apresentam 6 a 10 cisternas empilhadas (Fig. 1C, F), com as faces *cis*, *mediana* e *trans* facilmente identificáveis, mesmo nas preparações convencionais (Fig. 1D). Vesículas contendo material fibrilar foram observadas emergindo das extremidades das cisternas desde a região *cis* até a região do *trans-Golgi-network* (Fig. 1D). A proximidade de elementos do retículo endoplasmático rugoso com as cisternas dos dictiossomos (Fig. 1C, D) e com a membrana plasmática foi identificada (Fig. 2C). A coalescência entre vesículas contendo material fibrilar oriundas dos dictiossomos (Fig. 2E) e imagens sugestivas de fusão de vesículas com a membrana vacuolar (Fig. 2F), e conseqüente incorporação do conteúdo ao vacúolo, foram comumente observadas nessas células. Elementos do retículo endoplasmático ocorrem dispersos por todo o citoplasma (Fig. C, E-F) e concentrados nas proximidades dos dictiossomos (Fig. C-D) e nas proximidades da membrana plasmática (Fig. 2B). Imagens sugerem a ocorrência de fusão de vesículas (Fig. 2A) e de elementos do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 2B-C) com a membrana plasmática, com conseqüente liberação de seus conteúdos para fora do protoplasto, aqui denominado espaço periplasmático (Fig 2A, C, F). Imagens sugestivas de incorporação de corpos multivesiculares ao vacúolo foram comumente identificadas nessas células (Fig. 2B). Os plastídios são ovóides (Fig. 1B) ou polimórficos (Fig. 1G), desprovidos de

tilacóides, com estroma elétron-denso e corpos cristalóides que morfologicamente podem ser interpretados como proteínas (Fig. 1G).

Nas três espécies analisadas, a parede periclinal externa das células epiteliais possui estrutura complexa, com três estratos morfologicamente distintos: um estrato basal, mais interno, espesso e rico em polissacarídeos pécticos, um estrato fibroso elétron-denso e a cutícula. Na cutícula, verificam-se duas regiões: o estrato cuticular espesso com regiões reticulada e arborescente formadas por projeções dos polissacarídeos parietais, e a cutícula propriamente dita, mais delgada e destituída dessas ramificações. Esta organização da cutícula foi melhor identificada em *Simira corumbensis* (Fig. 2A).

Uma característica marcante das células epiteliais em todas as amostras analisadas foi a gradativa desestruturação de suas paredes durante o processo secretor. Foi possível verificar que este processo se iniciou com a desestruturação da lamela média e separação das paredes anticlinais, em regiões disjuntas da célula, formando sítios de acúmulo da secreção (Fig. 2C). Gradualmente estes sítios coalescem passando a ocupar toda a extensão da célula atingindo também a parede periclinal externa (Fig. 2D).

A desestruturação da parede periclinal externa pode ocorrer em um ou mais estratos. Em *Simira corumbensis*, a desestruturação se caracteriza pelo afastamento dos estratos basal e fibroso formando um amplo sítio de acúmulo da secreção (Fig. 2E). Desestruturação pontual do estrato fibroso foi comumente observada originando “bolsas” com acúmulo de secreção (Fig. 2E). Em *Warzewickzia* sp. a desestruturação ocorreu pela desintegração dos estratos basal e fibroso, formando camadas intercaladas de parede e espaços (Fig. 2F). Esta desestruturação pode atingir o estrato cuticular com a desestruturação da região arborescente. Em todas as amostras analisadas, a cutícula propriamente dita manteve-se intacta.

A solução do ZIO impregnou elementos do retículo endoplasmático, as membranas e o conteúdo das cisternas dos dictiossomos e das vesículas adjacentes (Fig. 3A-B). Em alguns dictiossomos, apenas as cisternas *trans*, com vesículas em suas extremidades dilatadas, foram marcadas pelo ZIO (Fig. 3C).

O método de Thiéry marcou os polissacarídeos presentes nos sítios de acúmulo de secreção, incluindo espaços formados pela desintegração da lamela média nas paredes anticlinais (Fig. 3D), espaço periplasmático (Fig. 3D-E, G), sítios na parede periclinal externa (Fig. 3E) e vacúolos (Fig. 3F). Este método também

possibilitou a marcação de polissacarídeos no interior e sobre a superfície externa da cutícula (Fig. 3F) demonstrando a permeabilidade da cutícula aos polissacarídeos. No citoplasma o método de Thiéry marcou o conteúdo das cisternas dos dictiossomas e de vesículas transportadoras evidenciando acúmulo de vesículas no citoplasma periférico adjacente à membrana plasmática. Em relação ao método do tetróxido de ósmio-imidazol não houve marcação de material nos sítios de acúmulo da secreção, confirmando a natureza hidrofílica da secreção.

Secreção mista (mucilagem, fenólicos e lipídios)

As células epiteliais dos coléteres em *Coccocypselum* sp. e *Tocoyena formosa* possuem vacuoma pouco desenvolvido e citoplasma abundante com dictiossomas bem desenvolvidos, mitocôndrias alongadas, retículo endoplasmático rugoso (RER) extensivo, plastídios e corpos lipídicos com formatos e tamanhos variáveis (Fig. 4A). Os vacúolos são esféricos e podem conter porções do citoplasma e de organelas podendo ser interpretados como vacúolos autofágicos (Fig. 4A) ou material finamente fibrilar (Fig. 4B-C). Os dictiossomas foram observados especialmente concentrados na região basal da célula, enquanto no pólo apical foram restritos ao citoplasma periférico (Fig. 4A). O RER apresenta formato de túbulos longos com disposição concêntrica em torno de vacúolos; caracteristicamente, esta disposição do RER foi observada unicamente no pólo apical das células epiteliais (Fig. 4A). Elementos do RER isolados foram observados no citoplasma periférico (Fig. 4A) e nas adjacências dos plastídios e dictiossomas (Fig. 4B-C). Os plastídios são ovais, com estroma granular, sistema de túbulos pouco desenvolvido e inclusões osmiofílicas fortemente marcadas com a solução de tetróxido de ósmio-imidazol (Fig. 4B). Os dictiossomas apresentam 10 a 12 cisternas com extremidades dilatadas originando vesículas (Fig. 4A, C). As paredes anticlinais apresentam aspecto laxo e contorno irregular (Fig. 4A). A parede periclinal externa (Fig. 4D) apresenta três estratos, o mais interno de composição péctica, o intermediário fibroso e elétron-denso e cutícula, que apresenta estrato cuticular espesso e com rede fibrilar elétron-densa desenvolvida. No estrato fibroso, ocorrem sítios de acúmulo de secreção formados pela desintegração de regiões pontuais da parede (Fig. 4D).

Os sítios de acúmulo da secreção incluem espaços intercelulares formados pela desestruturação da lamela média ao longo das paredes anticlinais (Fig. 4A),

vacúolos (Fig. B-C) e “bolsas” oriundas da desintegração de camadas parietais (Fig. 4D-E).

A solução do ZIO marcou diferencialmente as cisternas da face *trans* e o conteúdo das vesículas dos dictiossomas e as membranas de túbulos esparsos de retículo endoplasmático (Fig. 4C).

Acúmulos de material lipídico, marcados pelo método do tetróxido de ósmio-imidazol, foram evidenciados dispersos no citoplasma das células epiteliais, no interior de espaços intercelulares (Fig. 4A) e no estroma dos plastídios e interior de vacúolos (Fig. 4B). Pequenas gotículas de lipídios foram marcadas no estrato cuticular (Fig. 4D).

O método de Thiéry marcou polissacarídeos acumulados em “bolsas” no interior das paredes celulares entremeados aos lipídios e no estrato cuticular (Fig. 4E), nos vacúolos, espaço periplasmático e espaços intercelulares esquizógenos entremeados a gotas lipídicas (Fig. 4F).

Secreção predominantemente lipofílica (mucilagem, lipídios e resinas)

Células epiteliais dos coléteres de *Palicourea* sp., *Palicourea rigida* e *Guettarda viburnoides* se caracterizaram por apresentar abundância de corpos lipídicos intensamente marcados com a solução de tetróxido de ósmio-imidazol (Fig. 5A). Além disso, corpos lipídicos elétron-translucentes, não marcados pelo tetróxido de ósmio-imidazol, foram observados no citoplasma e nos espaços entre as células epiteliais (Fig. 5A-B). A parede periclinal externa possui estrato basal péctico reduzido e estrato fibroso elétron-denso espesso, que se projeta em direção ao estrato cuticular onde forma uma rede fibrilar elétron-densa (Fig. 5C).

A solução do ZIO permitiu identificar elementos do retículo endoplasmático dispersos pelo citoplasma das células epiteliais e localizados preferencialmente no citoplasma periférico (Fig. 5D-E). Elementos do retículo endoplasmático liso, tanto isolados como anastomosados, foram visualizados no citoplasma periférico (Fig. 5F). Nestas células, o envoltório nuclear (Fig. 5E) e vesículas dispersas no citoplasma periférico, adjacentes à membrana plasmática, (Fig. 5G) também foram marcados.

O método de Thiéry marcou os polissacarídeos da parede periclinal externa permitindo identificar nitidamente o estrato parietal basal desestruturado e “bolsas”

de secreção lipídica nos estratos basal e fibroso. Na cutícula, marcou os polissacarídeos das projeções do estrato fibroso (Fig. 5H).

Discussão

As análises ultraestruturais combinando métodos convencionais e ultracitoquímicos mostraram que coléteres morfologicamente semelhantes possuem particularidades subcelulares associadas com a natureza da secreção. Contudo, os sítios de compartimentalização e o mecanismo de eliminação da secreção foram comuns a todas as espécies estudadas.

Neste estudo, dictiossomos, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso (RER) e plastídios polimórficos contendo inclusões protéicas foram as organelas mais abundantes nas células epiteliais de coléteres produtores de secreção de natureza hidrofílica (Tabela 1). Tais características são compatíveis com a ultraestrutura de células envolvidas na síntese de mucilagem (Fahn 1979; Evert 2006, 2013; Paiva & Machado 2006). A proximidade de elementos do RER com a face *cis* dos dictiossomos hiperativos na produção de grandes vesículas, visíveis nas extremidades ou adjacências das cisternas dilatadas, confirma a participação dessas organelas na síntese e transporte da mucilagem, conforme sugerido por Horner & Lersten (1968). Imagens de fusão de vesículas com membrana plasmática são características de secreção granulócrica (Fahn 1979), em que a secreção contida nas vesículas é eliminada para o apoplasto via exocitose. Nos coléteres que apresentaram secreção mista ou predominantemente lipofílica, registramos gotas de lipídios no citoplasma periférico e nos espaços periplasmáticos. Estes aspectos indicam que este material pode atravessar a membrana plasmática por meio de molécula ativa ou processos iônicos (Fahn 2000) e se acumular fora do protoplasto, caracterizando secreção écrina (Evert 2006). Tais processos envolvem atividade metabólica intensa das células secretoras sendo compatível com a presença de numerosas mitocôndrias, com cristas desenvolvidas (Evert 2006, 2013; Paiva & Machado 2006).

A formação de vacúolos de armazenamento a partir da coalescência de vesículas oriundas dos dictiossomos, contendo polissacarídeos, é similar ao descrito em diferentes estruturas secretoras de mucilagem (Fahn 1979). Em nosso estudo, imagens de fusão de elementos do RER com a membrana plasmática suportam a possibilidade da participação direta do RER na exportação da mucilagem para fora

do protoplasto, conforme sugerido por Horner & Lersten (1968). Além disso, tais aspectos do RER associados com a abundância de ribossomos livres indicam intensa síntese e transporte de enzimas (Bertachini-Lombello & Carvalho 2013), as quais são necessárias para os processos de desestruturação de paredes celulares (Paiva & Machado 2006, Miguel et al. 2010; Machado et al. 2012). De fato, a desestruturação das paredes anticlinais e periclinal externa, originando espaços que funcionam como sítios temporários de acúmulo de secreção, foi uma das características mais marcantes das células epiteliais em todos os coléteres estudados, independentemente da natureza da secreção.

O mecanismo de eliminação da secreção para a superfície do coléter e a presença/ ausência de cutícula são temas recorrentes em estudos ultraestruturais (Klein 2004; Miguel et al. 2006, 2010; Barreiro & Machado 2007; Machado et al. 2012; Coelho et al. 2013). Nossos estudos permitiram distinguir três camadas na parede periclinal externa das células epiteliais dos coléteres estudados similares às descritas nos coléteres de outras espécies de Rubiaceae (Klein et al. 2004; Miguel et al. 2006,2010; Machado et al. 2012). A presença de rede fibrilar elétron-densa na camada cuticular das células secretoras tem sido interpretada como um meio para a difusão da secreção, tanto hidrofílica como lipofílica (Jeffree 1996). De fato, os testes ultracitoquímicos revelaram polissacarídeos e granulações lipídicas no estrato cuticular, sugerindo sua difusão através da cutícula.

Neste trabalho sugerimos que a externalização da secreção para a superfície dos coléteres provavelmente é facilitada pela pressão provocada pelo acúmulo de material nos espaços intercelulares esquizogênicos ao longo das paredes anticlinais e nos espaços da parede periclinal externa, originados pelo desarranjo dos estratos basal e fibroso. A passagem de moléculas pode ser ainda favorecida pela formação de “bolsas” no estrato fibroso das paredes periclinais ou microcanais no estrato cuticular das células epiteliais, o que facilita o fluxo do material para o meio externo sem que haja rompimento da cutícula (Kim & Mahlberg 1995, Miguel et al. 2010, Evert 2006, Coelho et al. 2013). De fato, não observamos ruptura de cutícula em nenhuma das amostras analisadas.

A abundância de polissacarídeos nos coléteres envolvidos em secreção hidrofílica, evidenciados como material fibrilar ou granular em preparações convencionais foi marcada pelo método de Thiéry no interior das cisternas dos dictiosomos e suas vesículas, vacúolos, espaço periplasmático, espaços

intercelulares, sítios no interior da parede periclinal externa e cutícula, enquanto a ausência de lipídios foi comprovada pelo método do ósmio-imidazol. Já, nos coléteres com secreção mista a presença de polissacarídeos foi confirmada pelo método de Thiéry, embora em menor abundância, enquanto o método do ósmio-imidazol evidenciou corpos lipídicos no citoplasma, nos espaços intercelulares e na parede periclinal externa. Nos coléteres com secreção predominantemente lipofílica foi possível identificar granulações lipídicas no estrato cuticular, sugerindo que moléculas podem atravessar a cutícula intacta e atingir a superfície do coléter. A elétron-densidade variável da secreção lipofílica, evidenciada tanto nas preparações convencionais quanto com o uso de método citoquímico, provavelmente se deve a presença de lipídios insaturados (marcados com o ósmio-imidazol) e resinas (não marcadas por este método). O uso de métodos ultracitoquímicos diversos, complementares à análise histoquímica, é necessário para o refinamento de investigações sobre componentes específicos da secreção permitindo identificar sítios de síntese, acúmulo temporário e vias de eliminação.

O uso do método do ZIO confirmou que os dictiossomas constituem a população de organelas mais abundantes nos coléteres envolvidos em secreção hidrofílica, confirmando o padrão comumente descrito para células secretoras de mucilagem por Fahn (1979). A marcação diferencial das cisternas *cis* (reação fraca ou ausente) em relação às cisternas *trans* (densamente coradas), foi igualmente relatada por Machado e Gregório (2001) em nectários, e segundo as autoras indica atividade diferencial das cisternas dos dictiossomas relacionada com a maturação da organela ou com mudanças durante o processo secretor. Nos coléteres com secreção predominantemente lipofílica, o ZIO confirmou a predominância de elementos do retículo endoplasmático liso nas células epiteliais, os quais foram pouco evidentes nas preparações convencionais.

Em todas as amostras analisadas a reação com o ZIO, além de permitir melhor visualização das membranas das organelas envolvidas no processo secretor, marcou o conteúdo das cisternas e vesículas. Segundo Gilloteaux e Naud (1979) esta reação se deve ao fato do Zn^{+2} se ligar ou deslocar sítios de Ca^{+2} das membranas das organelas reduzindo o ósmio a osmato de zinco que é observado na forma de depósitos elétron-densos. De acordo com Maillet (1962), a solução do ZIO atua desacoplando porções lipídicas de lipoproteínas complexas, expondo novamente os grupos de lipídeos, o que aumenta a disponibilidade de deposição do osmato de

zinco. Conforme ressaltado por Machado e Gregório (2001), o uso deste método no estudo de células secretoras em plantas facilita a observação das organelas e o acompanhamento das mudanças subcelulares que geralmente ocorrem durante o ciclo secretor.

Em conclusão, a combinação de métodos ultraestruturais convencionais e ultracitoquímicos permitiu identificar a população de organelas e suas propriedades funcionais nas células epiteliais de coléteres com secreções de naturezas distintas, além de evidenciar os sítios intra e extracelulares de acúmulo temporário da secreção e comprovar a participação da parede periclinal externa na liberação da secreção.

Agradecimentos

Este artigo é parte da tese de doutorado de Fernanda Tresmondi. Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Projeto 2008/55434-7 e Bolsa 2011/02488-5) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Projeto 473289/2010 e Bolsa de Produtividade para Machado, S.R.). Nós agradecemos a Yve Canaveze pelo auxílio na preparação das figuras e aos funcionários do ‘Centro de Microscopia Eletrônica (IBB, UNESP)’ pela assistência no preparo das amostras para as análises ultraestruturais convencionais e a Shelly Favorito pelo auxílio nas preparações ultracitoquímicas.

Referências bibliográficas

- Angermüller, S., Fahimi, D.H. 1982.** Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *Histochemistry Journal*. 14: 823-825.
- Barreiro D.P., Machado S.R. 2007.** Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. *Revista Brasileira de Botanica*. 30:387-399.
- Bertachini-Lombello, C., Carvalho, H.F. 2013.** Retículo endoplasmático. *In*: Carvalho, H.F., Recco-Pimentel, S.M. **A Célula**. Barueri, SP: Manole, 2013.
- Coelho V.P.M, Leite J.P.V., Fietto L.G., Ventrella M. C. 2013.** Colleters in *Bathysa cuspidate* (Rubiaceae): Development, ultrastructure and chemical composition of the secretion . *Flora* 208:579 – 590.
- Evert, R.F., 2006.** Esau’s Plant Anatomy, Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

- Evert R.F. 2013.** Anatomia das plantas de Esau, meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento\ trad. Da 3° ed. Americana – São Paulo: Blucher, 2013.
- Fahn A. 1979.** Secretory tissues in plants. London: Academic Press.
- Fahn A. 2000.** Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31: 37-75.
- Gilloteaux, J., Naud, J. 1979.** The zinc iodide-osmium tetroxide staining-fixative of Maillet. *Histochemistry* 63: 227-243.
- Horner HT, Lersten NR. 1968.** Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 55: 1089–1099.
- Jeffree, C.E. 1996.** Structure and ontogeny of plant cuticles. *Plant cuticles: an integrated functional approach*. BIOS Scientific Publishers Ltd.: Oxford, UK, 33-82.
- Kim, E.S., Mahlberg, P.G. 1995.** Glandular cuticle formation in *Cannabis* (Cannabaceae). *American Journal of Botany* 82:1207-1214.
- Klein D.E. Gomes V.M., Silva-Neto S.J., Cunha M. 2004.** The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). *Annals of Botany* 94: 733–740.
- Lersten NR. 1974.** Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia* (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of Linnean Society* 69: 125–136.
- Machado, S.R., Gregório, E.A. 2001.** Zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reactive sites in the extrafloral nectary of *Citharexylum mirianthum* Cham. (Verbenaceae). *Tissue & Cell*, 33: 72-77.
- Machado S.R., Barreiro D.P., Rocha J.F., Rodrigues T.M. 2012.** Dendroid colleters on vegetative and reproductive apices in *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) differ in ultrastructure and secretion. *Flora* 207: 868– 877.
- Maillet, M. 1962.** Le reactif au tetraoxyde d'osmium-iodure au zinc. *Z. Zellforsch* 70: 397-406.
- Miguel E.C., Gomes V.M., Oliveira M.A., Da Cunha M. 2006.** Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): Ultrastructure, Secretion Protein Composition, and Antifungal Activity. *Plant Biol.* 8: 715–722.

- Miguel E.M., Klein D.E., Oliveira M.A., Da Cunha M. 2010.** Ultrastructure of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulata* (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 33: 425-436.
- Paiva E.A.S, Machado S.R. 2006.** Colleter in *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae): ontogenesis, ultrastructure and secretion. *Brazilian Journal of Biology* 66: 301-308.
- Reinecke, M., Walther, C. 1978.** Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular sh-groups. *Journal of Cell Biology* 21: 839-855.
- Reynolds, E.S. 1963.** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*, 17: 208-212.
- Roshchina, V.V., Roshchina, V.D. 1993.** Excretory function of higher plants. Springer-Verlag.
- Thomas V. 1991.** Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleters. *Annals of Botany* 68:287–305.

Tabela e Figuras

Tabela 1. Natureza da secreção, espécies de Rubiaceae estudadas e respectivo número de registro no Herbário BOTU.

| Natureza da secreção* | Espécie | Registro BOTU |
|------------------------------|---|----------------------|
| Hidrofilica | <i>Psychotria barbiflora</i> DC. | 28477 |
| | <i>Simira corumbensis</i> (Standl.) Steyerm. | 28490 |
| | <i>Warzewiczia</i> Klotzsch. | 28513 |
| Mista | <i>Coccocypselum</i> sp. P. Browne | 28502 |
| | <i>Tocoyena formosa</i> Cham. & Schltdl. | 28506 |
| Predominantemente lipofílica | <i>Guettarda viburnoides</i> Cham. & Schltdl. | 28482 |
| | <i>Palicourea rigida</i> Kunth. | 28484 |
| | <i>Palicourea</i> sp. Aubl. | 28514 |

*Fonte: Tresmondi et al. (*under review*)

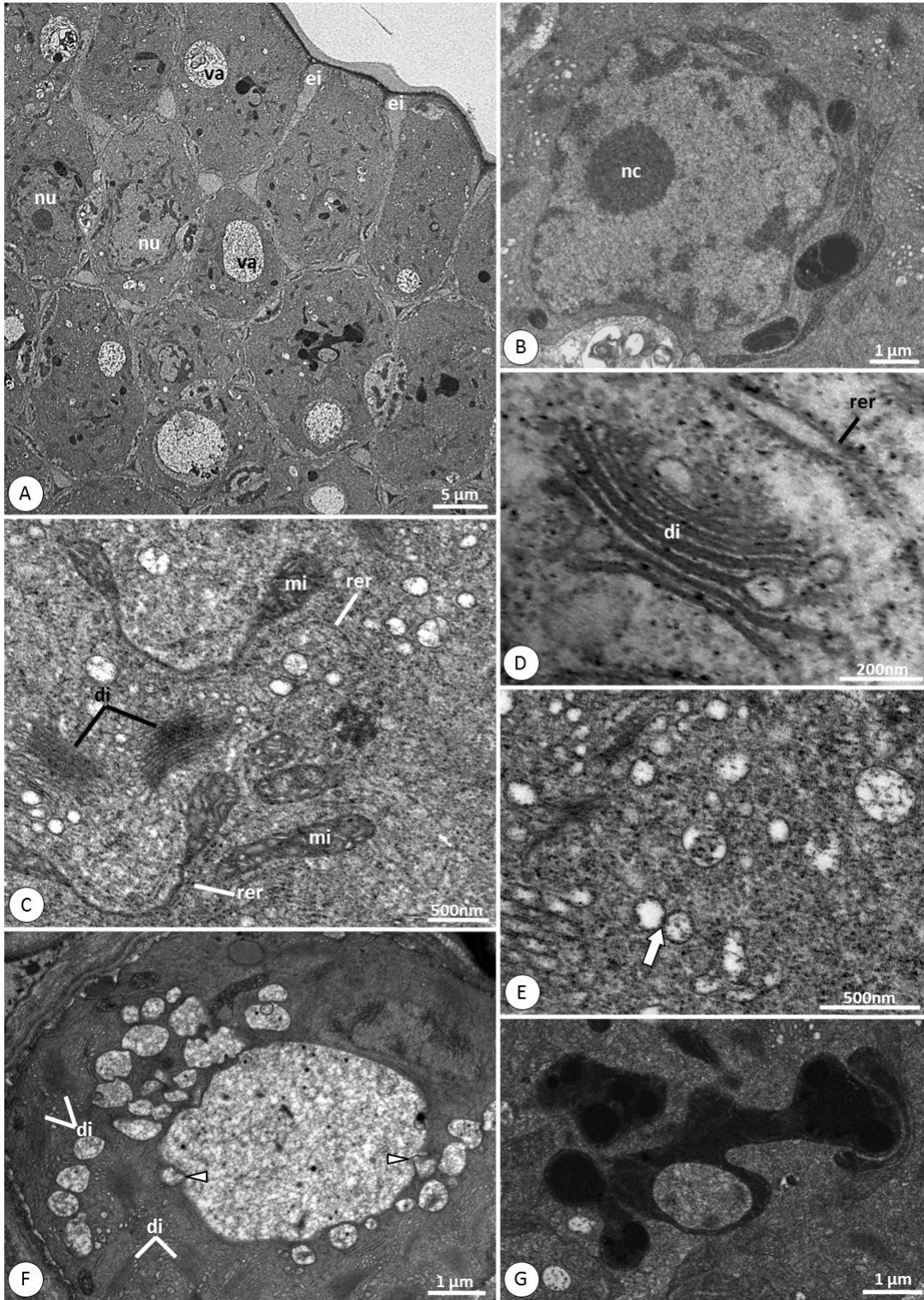


Figura 1. Células epiteliais de coléteres padrão de *Simira corumbensis* (A, B, C, E, G), *Psychotria barbiflora* (D) e *Warzewickzia* sp. (F) vistas ao MET em preparações convencionais. **A.** Aspecto geral de células epiteliais mostrando cutícula irregularmente espessada, vacuoma pouco desenvolvido e citoplasma abundante. Os vacúolos (va) apresentam conteúdo fibrilar. **B.** Núcleo com contorno lobado e nucléolo (nc) compacto. **C.** Citoplasma rico em ribossomos livres, mitocôndrias (mi) alongadas com cristas desenvolvidas, dictiossomos (di) com brotamento de vesículas nas extremidades das cisternas e elementos de retículo endoplasmático rugoso (rer). **D.** Dictiossomo (di) e elemento do retículo endoplasmático rugoso (rer). **E.** Vesículas oriundas dos dictiossomos contendo material fibrilar. Observe vesículas justapostas (seta). **F.** Vesículas justapostas com conteúdo fibrilar e associadas com a membrana vacuolar (pontas de seta). Note abundância de dictiossomos (di). **G.** Plastídio polimórfico com estroma denso contendo inclusões cristalóides elétron-densas.

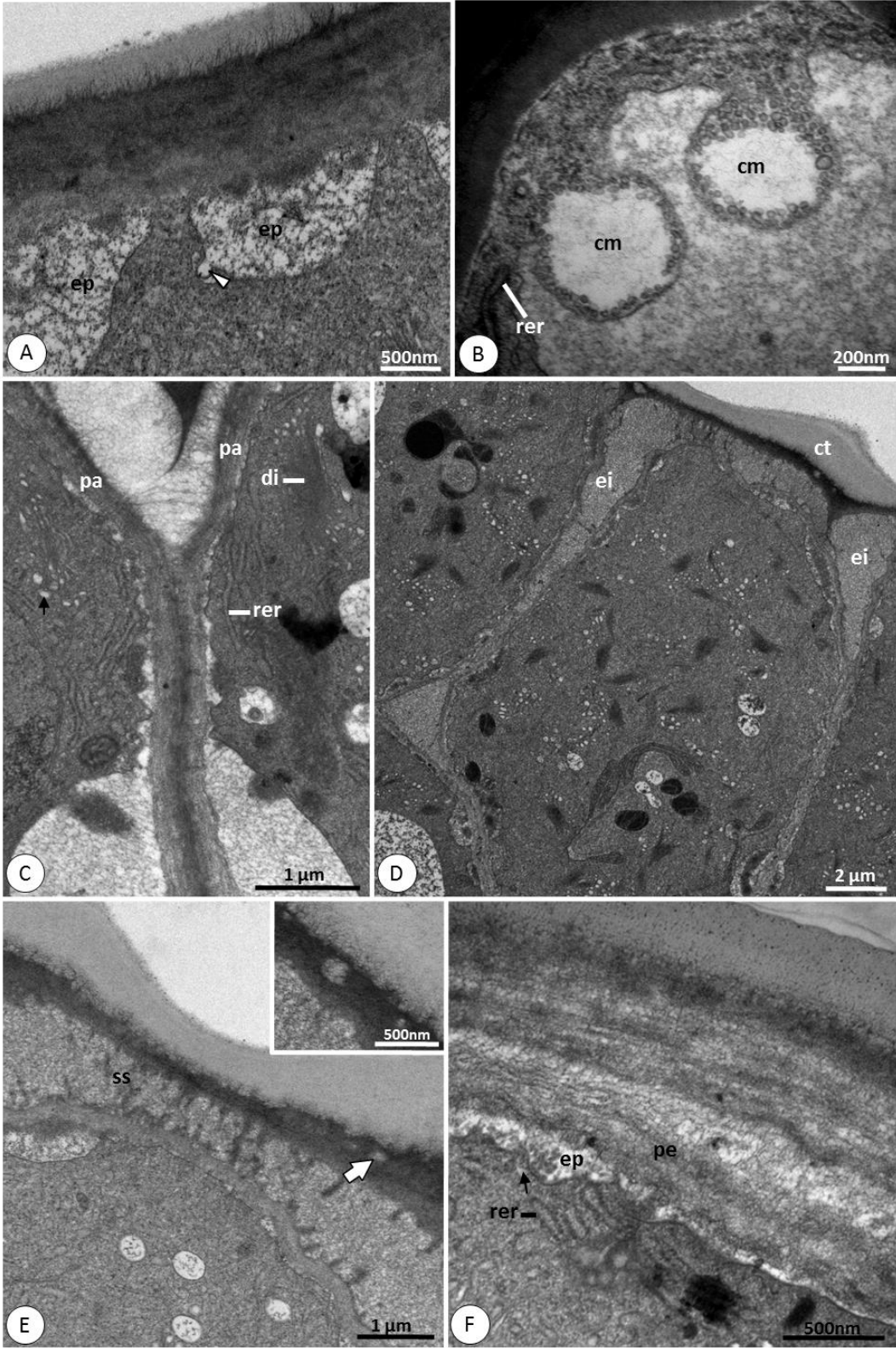


Figura 2. Células epiteliais de coléteres padrão de *Simira corumbensis* (A, D, E) e *Warzewickzia* sp. (B, C, F) vistas ao MET em preparações convencionais. **A.** Vesícula associada à membrana plasmática (ponta de seta) e espaço periplasmático (ep) com conteúdo fibrilar. Na parede periclinal externa, notam-se o estrato basal mais interno, o estrato fibroso elétron-denso e ramificações elétron-densas no estrato cuticular. **B.** Corpos multivesiculares (cm) associados à membrana do vacúolo. No citoplasma periférico, elementos do retículo endoplasmático rugoso (rer). **C.** Parede anticlinal (pa) com sinais de desestruturação da lamela média resultando na formação de sítio de acúmulo da secreção. No citoplasma periférico observar dictiossomos (di), vesículas (seta) e elementos do retículo endoplasmático rugoso (rer) justapostos a membrana plasmática. **D.** Espaços intercelulares (ei) amplos resultantes da desestruturação da lamela média e separação das paredes anticlinais; no pólo distal da célula, o espaço é formado pela separação dos estratos parietais, exceto da cutícula (ct). **E.** Detalhe do pólo distal da célula mostrando sítio de acúmulo da secreção (ss) resultante da separação dos estratos internos da parede periclinal externa. No detalhe (canto superior direito) “bolsa” (seta) com acúmulo de secreção no estrato fibroso. **F.** Pólo apical da célula epitelial evidenciando parede periclinal externa (pe) com sinais de desintegração. Observar elementos do retículo endoplasmático rugoso (rer) e vesículas (seta) adjacentes à membrana plasmática; material granular no espaço periplasmático (ep).

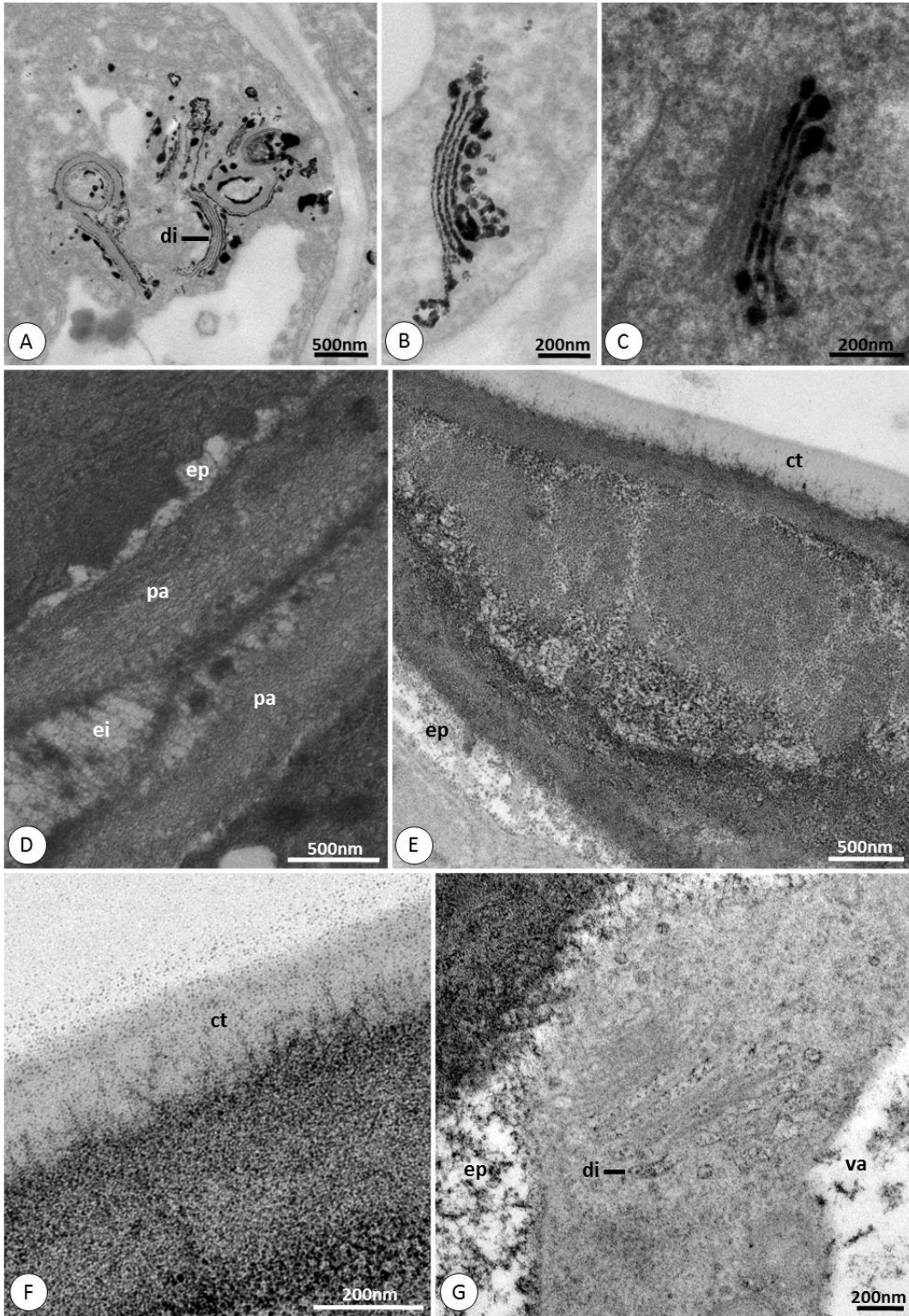


Figura 3. Células epiteliais de coléteres padrão de *Psychotria barbiflora* (A), *Warzewickzia* sp (B, C, D) e *Simira corumbensis* (F, G) vistas ao MET em preparações citoquímicas. **A.** Dictiossomos (di) e elementos de retículo endoplasmático marcados pela técnica do ZIO. **B.** Detalhe de dictiossomo mostrando marcação do conteúdo das cisternas e vesículas associadas. **C.** Dictiossomo com marcação de ZIO na face *trans*. **D.** Polissacarídeos no espaço periplasmático (ep) e espaço intercelular (ei) marcados pelo método de Thiéry. Parede anticlinal (pa) com arranjo microfibrilar frouxo. **E.** Polissacarídeos na cutícula (ct), em espaço da parede periclinal externa e espaço periplasmático (ep) marcados pelo método de Thiéry. **F.** Detalhe mostrando marcação de polissacarídeos no interior e sobre a superfície da cutícula (ct) pelo método de Thiéry. **G.** Marcação de polissacarídeos no interior das cisternas e vesículas dos dictiossomos (di), vesículas transportadoras, vacúolos (va) e espaço periplasmático (ep).

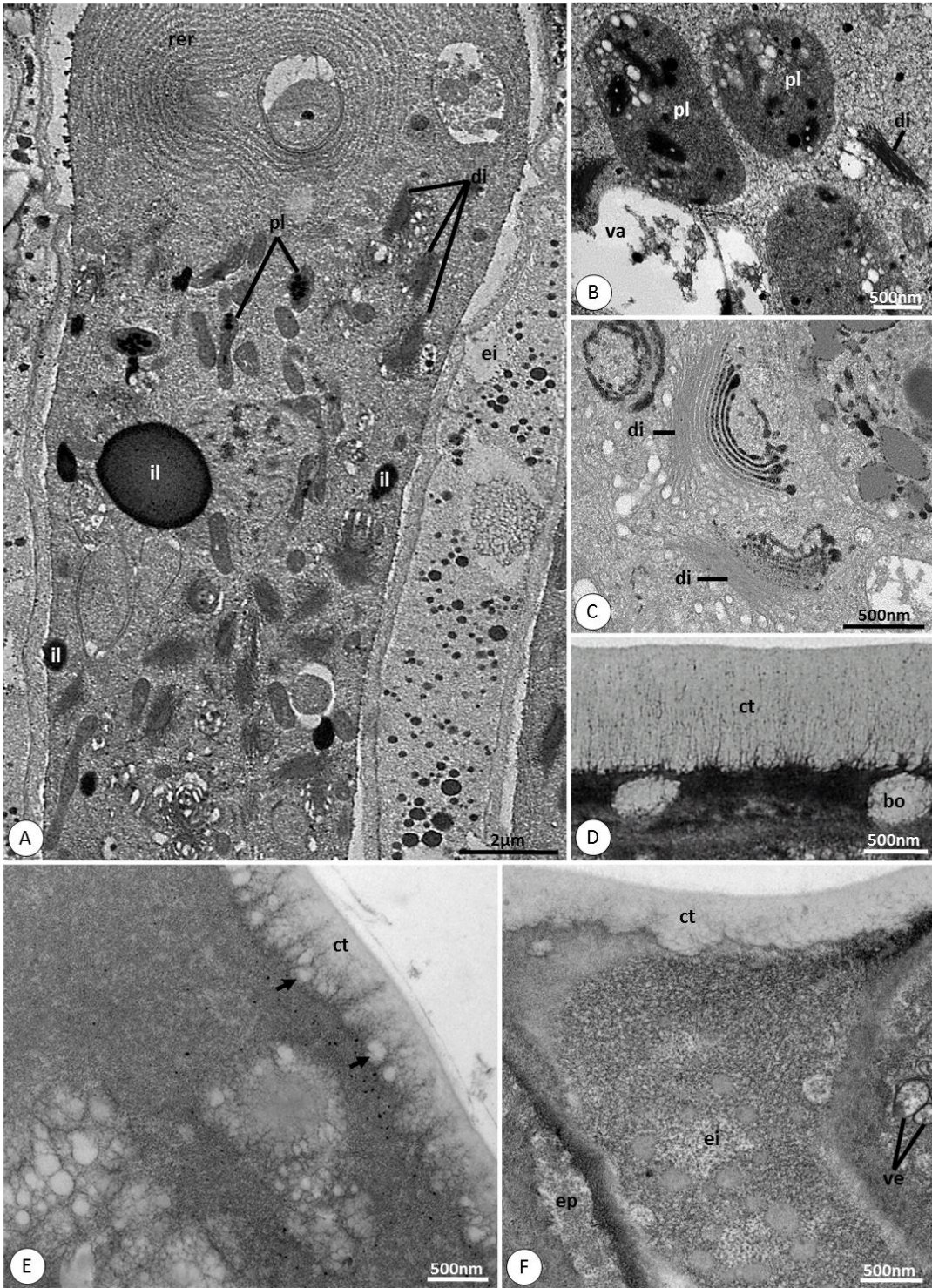


Figura 4. Células epiteliais de coléteres padrão de *Tocoyena formosa* (A, B, D-F) *Coccocypselum* sp. (C). **A.** Célula epitelial com parede anticlinal laxa e citoplasma rico em organelas. Observar retículo endoplasmático rugoso (rer) disposto concentricamente ao redor de vacúolos contendo material citoplasmático e organelas. Observar inclusões lipídicas (il) no citoplasma e no espaço intercelular (ei) marcadas com solução de tetróxido de ósmio-imidazol. **B.** Inclusões lipídicas nos plastídios (pl) e vacúolos (va) marcadas com solução de tetróxido de ósmio-imidazol. Observar dictiossomo (di) associado a vesículas. **C.** Elementos de retículo endoplasmático e dictiossomos (di) com cisternas *trans* marcadas pelo ZIO. **D.** Parede periclinal externa mostrando estrato fibroso com sinais de degradação e “bolsas” (bo) de acúmulo de secreção contendo material fibrilar. Observar cutícula (ct) espessa com densa rede de fibrilas elétron-densas e grânulos de lipídio marcados com solução de tetróxido de ósmio-imidazol. **E.** Parede periclinal externa com “bolsas” (setas) de acúmulo de secreção preenchidas com lipídios e polissacarídeos marcados pelo método de Thiéry. **F.** Polissacarídeos na cutícula (ct), espaço intercelular (ei), espaço periplasmático (ep) e vesículas (ve) marcadas pelo método de Thiéry. Observar inclusões esféricas de material lipídico entremeado aos polissacarídeos.

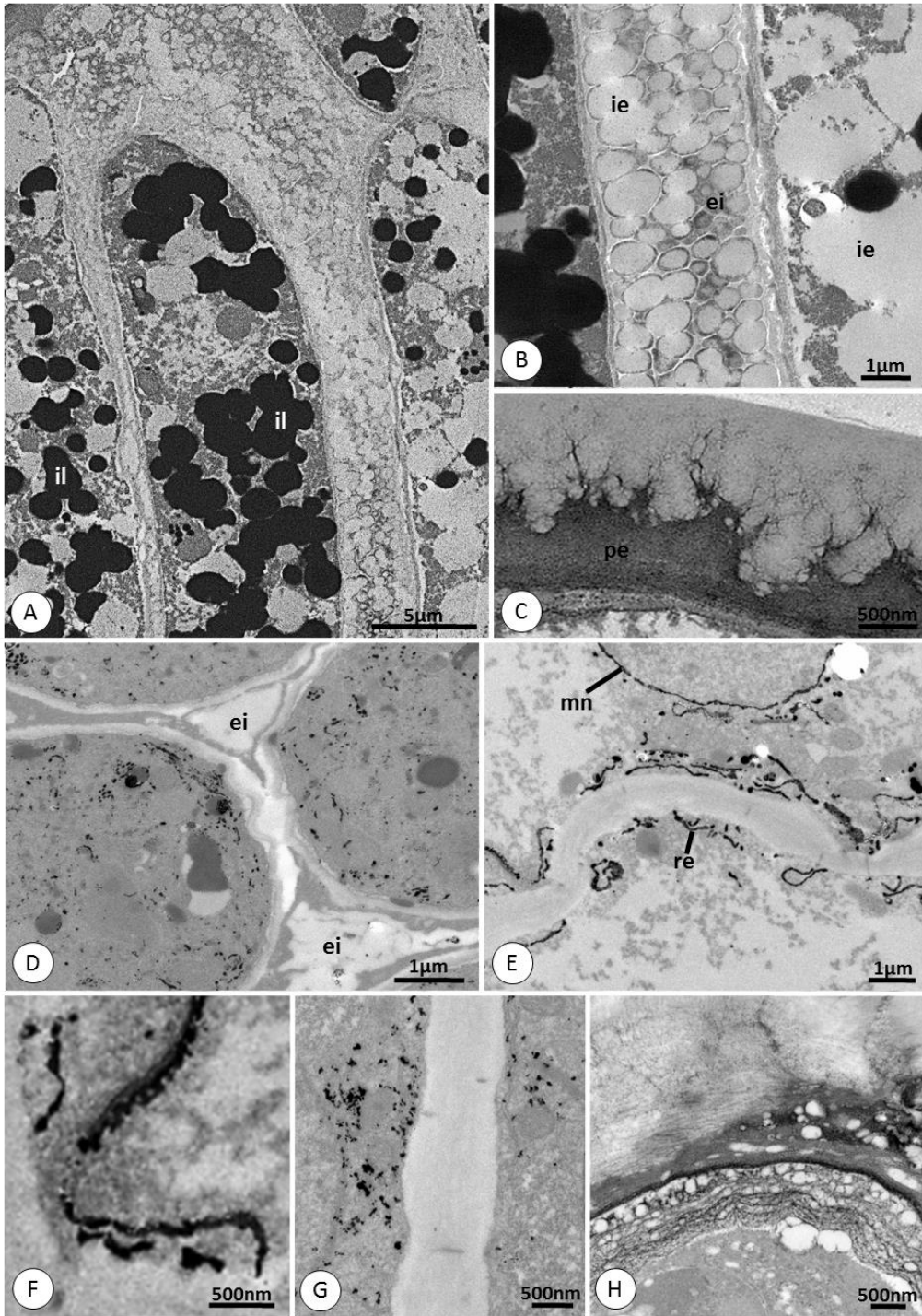


Figura 5. Células epiteliais de coléteres de *Palicourea rigida* (A-G), *Guettarda viburnoides* (H) **A.** Visão geral de células epiteliais contendo inclusão lipídica (il) marcado com solução de tetróxido de ósmio-imidazol. **B.** Detalhe mostrando inclusões elétron-translucentes (ie) dispersas no citoplasma e no espaço intercelular. **C.** Parede periclinal externa (pe) com estrato fibroso elétron-denso projetando-se no estrato cuticular. **D.** Células epiteliais com organelas marcadas pelo ZIO. **E.** Elementos do retículo endoplasmático (re) no citoplasma periférico e membrana nuclear (mn) marcados pelo ZIO. **F.** Túbulos isolados ou anastomosados do retículo endoplasmático liso marcados pelo ZIO. **G.** Vesículas e túbulos com conteúdo marcado pelo ZIO no citoplasma periférico. **H.** Polissacarídeos da parede periclinal externa marcados pelo método Thiéry. Observar estratos parietais desestruturados.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Capítulo 3

Nota elaborada segundo as normas do periódico *Botany*

Investigating leaf nodulating and non-nodulating bacteria in Neotropical species of Rubiaceae

26 **Introduction**

27 It is well known that interaction with bacteria can provide benefits to the host
28 plant (Verstraete et al. 2013). There is evidence of relatively recent origin of bacterial-
29 leaf symbiosis in Angiosperms back to the Miocene (5-23 Mya), a geological epoch
30 characterized by arid and cool climate (Lemaire et al., 2011). Bacterial endophytes
31 associated with leaves of Rubiaceae have been studied in order to understand the
32 evolution of this specific symbiosis, and two categories of leaf bacteria interactions
33 have been described, nodulating and non-nodulating (Van Oevelen et al. 2001, 2004;
34 Lemaire et al. 2011, 2012).

35 Most of the registers of nodulated species refers to three genera of Rubiaceae,
36 *Psychotria*, *Pavetta* and *Sericanthe*, with 6%, 87% and 64% of all studied species
37 presenting leaf nodules, respectively. A likely relationship between dendroid colleter,
38 mucilaginous secretions, and bacterial leaf nodule formation has been described for
39 Rubiaceae species (Lersten 1975, Thomas 1991, Van Oevelen et al. 2012). Bacteria use
40 the mucilaginous secretion produced by the dendroid colleter as a source of nutrition
41 and a means of penetrating the leaves through the stomata, thus initiating bacterial leaf
42 nodule formation (Lersten 1975, Thomas 1991). However, the presence of nodules does
43 not appear to be exclusively associated with dendroid colleters because while most of
44 the leaf-nodulated *Neorosea* species exhibit dendroid or brush-like colleters, standard
45 and intermediate types also occur, though at a lower frequency (Lersten 1974b).

46 In this study we investigated the relationship between colleter morphotypes and
47 the nature of secretion with the occurrence of the two categories of endophytes
48 associated with leaves, nodulating and non-nodulating bacteria, in Rubiaceae species
49 occurring in savanna and tropical forest from Brazil.

50

51 **Material and Methods**

52 We studied 17 species of Rubiaceae occurring in Brazilian savanna and seasonal
53 semi deciduous tropical forest in São Paulo state, Brazil (Table 1). We evaluated leaves
54 in different developmental stages with the naked eye and viewed them under a stereo-
55 microscope looking for nodules presence. Additionally, we analyzed cross-sections of
56 the leaf blade under light microscope to confirm the occurrence of nodules and to
57 investigate the occurrence of bacteria in the intercellular spaces along the leaf blade.
58 The absence of nodules in these species was confirmed by 10 replicas per species, in
59 order to avoid the chance of possible undetected infections. As we did not detect the
60 occurrence of nodules using these methods, we selected *Psychotria barbiflora* and *P.*
61 *marcgravii* to conduct more detailed studies because the nodule presence has been
62 extensively referred to this genus of Rubiaceae (Miller, 1990). For this purpose, three
63 leaves of each individual were collected (n=5 plants), totaling 15 leaves from each
64 species, for scanning electron microscopy (SEM) and microbiological culture analyses.
65 For the microbiological analyses, the material was disinfected, followed by inoculation
66 in Petri dishes using NSA (nutrient sucrose agar) culture medium. The Petri dishes were
67 kept in a climate chamber for approximately 30 days with a 12 hour/12 hour
68 photoperiod at 25°C. After this period, we removed the Petri dishes to evaluate growth
69 by visual inspection and to count the number of colony forming units following the
70 usual procedures as described by Dhingra and Sinclair (1995). For SEM analyses
71 samples of young leaves were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer,
72 pH 7.3, for 24 hours, then post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate
73 buffer, pH 7.3, for 1 hour, dehydrated in an ascending ethanol series, critical point dried
74 using liquid CO₂, mounted on aluminum stubs, and gold sputtered (Robards, 1978). The

75 material was observed and documented using a Quanta Fei scanning electron
76 microscope at 20 kV.

77

78 **Results**

79 We did not find bacterial leaf nodules in any of the 17 species studied throughout
80 visual inspection as well as histological and SEM micromorphological analysis. In non-
81 nodulated species of *Psychotria*, although we didn't observe colony forming units, we
82 registered endophytes by SEM analysis. The endophytes measuring 0,1-0,2 μm in
83 length, occurred in clusters within of leaf epidermal cells (Fig. 1A), and mesophyll cells
84 (Fig. 1B, C) along the whole leaf blade.

85

86 **Discussion**

87 All the Rubiaceae species, from both environments savanna and forest, were
88 non-nodulated, even those with dendroid colleters, *Alibertia sessilis* and *A. concolor*.
89 Thus, our results do not corroborate the hypothesis put forth by Lersten (1975), who
90 proposed the existence of a relationship between nodulated species and dendroid
91 colleters, given that colleters of this type exclusively occur in Rubiaceae. According to
92 this author, upon entering the leaf primordia via the stomata, the bacteria would have
93 triggered a gradual evolutionary change in these structures in regard to the elongation
94 and separation of the epidermal cells forming the secretory epithelium, in addition to
95 changes associated with the secretion product (Lersten 1975).

96 As previously reported for *Alibertia sessilis*, dendroid colleters exhibited
97 resinous secretions, that forms a rigid and hydrophobic cover surrounding the vegetative
98 apex, most likely preventing microbial entry (Barreiro and Machado 2007). These
99 results, observed in both *Alibertia* species studied herein, from forest and savanna,

100 reinforce our hypothesis that factors related to the composition of secretions determine
101 this symbiotic process to a greater extent than the colleter morphotype.

102 Brazilian savanna and seasonal semi deciduous forest are characterized by low
103 air relative humidity and seasonal high temperatures (Tresmondi et al, *unpublished*
104 *data*), which may cause the mucilage to dehydrate, preventing bacterial development
105 and nodule formation (Van Oevelen et al. 2003). This climate conditions may have been
106 a determinant ecological filter for the absence of this association in the species studied
107 here. Additionally, we highlight that the presence of alkaloids and phenolics in the
108 colleter secretory cells of these species may be additional factor preventing
109 microorganisms establishment.

110 To date, this is the first register of the occurrence of non-nodulating endophytes
111 living in the mesophyll from Neotropical Rubiaceae species. Lemaire et al. (2012)
112 registered 22 African non-nodulated *Psychotria* species, housing endophytes among
113 mesophyll cells. Distinctly, we observed endophytes living inside the epidermal and
114 mesophyll cells of *Psychotria barbiflora*. In this group of Rubiaceae species, classified
115 as non-nodulated bacteriophilous clade by Lemaire et al. (2012), the bacteria are
116 members of the genus *Burkholderia*, closely related to the leaf-nodulated
117 endosymbiontes of Rubiaceae. Bacteria of this genus are very abundant and occupy
118 several different types of niches; they can be epiphytic, endophytic, or free-living in the
119 rhizosphere (Compant et al. 2008). These bacteria occur in soils of diverse Brazilian
120 environments, including savanna and forest (Bruce et al. 2012, Oliveira et al. 2009), and
121 are therefore not a limiting factor for the occurrence of symbiosis with the plant species
122 studied here. Our study encompassed two Brazilian ecosystems, savanna and seasonal
123 tropical forest, nevertheless broader studies involving Rubiaceae species of other
124 ecosystems, e.g. pluvial tropical forest and dry forest, may reveal other species

125 harboring the non-nodulating endophytes. Additionally, the endophyte identification
126 based on genetic material, using molecular markers, is necessary to determine
127 unequivocally the presence and the taxonomic group of non-nodulated endophytes
128 associated with this South-American *Psychotria* species.

129

130 **Aknowledgment**

131 This article is part of the doctoral thesis of F. Tresmondi. Funding come from
132 the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2008/55434-7
133 and grant 2011/02488-5) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
134 Tecnológico (CNPq, 473289/2010 and Grant to Machado, S.R.). We thanks to the staff
135 of ‘Centro de Microscopia Eletrônica (IBB, UNESP)’ for SEM assistance and to
136 Cristiane de Pieri for assistance in microbiology.

137

138 **References**

- 139 Barreiro, D.P., and Machado, S.R. 2007. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis*
140 (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. Revista Brasileira de
141 Botanica. 30:387-399.
- 142 Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C., and Barka E.A. 2008. Diversity and
143 occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. FEMS microbiology
144 reviews. 32: 607-626.
- 145 Dhingra, O.D., and Sinclair, J.B. 1995. Basic plant pathology methods, 2nd Ed. CRC
146 Press London. p. 434.
- 147 Lemaire, B., Robbrecht, E., van Wyk, B., Van Oevelen, S., Verstraete, B., Prinsen, E.,
148 Smets, E., and Dessein, S. 2011. Identification, origin and evolution of leaf
149 nodulating symbionts of *Sericanthe* (Rubiaceae). J Microbiol. 49: 935–941.

- 150 Lemaire, B., Van Oevelen, S., De Block, P., Verstraete, B., Smets, E., Prinsen, E., and
151 Dessein S. 2012a. Identification of the bacterial endosymbionts in leaf nodules of
152 *Pavetta* (Rubiaceae). International Journal of Systematic and Evolutionary
153 Microbiology. 62: 202–209.
- 154 Lemaire, B., Lachenaud, O., Persson, C., Smets, E., and Dessein, S. 2012b. Screening
155 for leaf-associated endophytes in genus *Psychotria* (Rubiaceae). FEMS
156 Microbiology Ecol. 81 (2):364-72.
- 157 Lersten, N.R. 1974b. Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia*
158 (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. Botanical
159 Journal of the Linnean Society. 69: 21 125-136.
- 160 Lersten, N.R. 1975. Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial
161 leaf nodule symbiosis. Botanical Journal of the Linnean Society. 71: 311-319.
- 162 Miller, I.M. 1990. Bacterial leaf nodule symbiosis, Advanced Botanical Research. 17:
163 163–243.
- 164 Oliveira, M.C., Simões, K., and Braga, M.R. 2009. Substâncias antifúngicas
165 constitutivas e induzidas em folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides*
166 (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). Revista Brasileira de Botânica. 32: 509-519
- 167 Thomas, V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleters.
168 Annals of Botany. 68: 287–305.
- 169 Van Oevelen, S., Prinsen, E., De Wachter, R., and Robbrecht, E. 2001. The taxonomic
170 value of bacterial symbiont identification in African *Psychotria*
171 (Rubiaceae). Systematics and Geography of Plants. 557-563.
- 172 Van Oevelen, S., De Wachter, P., Robbrecht, E., and Prinsen, E. 2003. Induction of a
173 crippled phenotype in *Psychotria* (Rubiaceae) upon loss of the bacterial
174 endophyte. Bulgaria Journal Physiology. Especial issue: 242–24.
- 175 Van Oevelen, S., De Wachter, R., Vandamme, P., Robbrecht, E., and Prinsen, E. 2004.
176 Candidatus *Burkholderia calva*’ and ‘Candidatus *Burkholderia nigropunctata*’ as

177 leaf gall endosymbionts of African *Psychotria*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54:
178 2237–2239.

179 van Oevelen, D., Soetaert, K., and Heip, C. 2012. Carbon flows in the benthic food web
180 of the Porcupine Abyssal Plain: The (un) importance of labile detritus in
181 supporting microbial and faunal carbon demands. *Limnology and*
182 *Oceanography.* 57: 645-664.

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

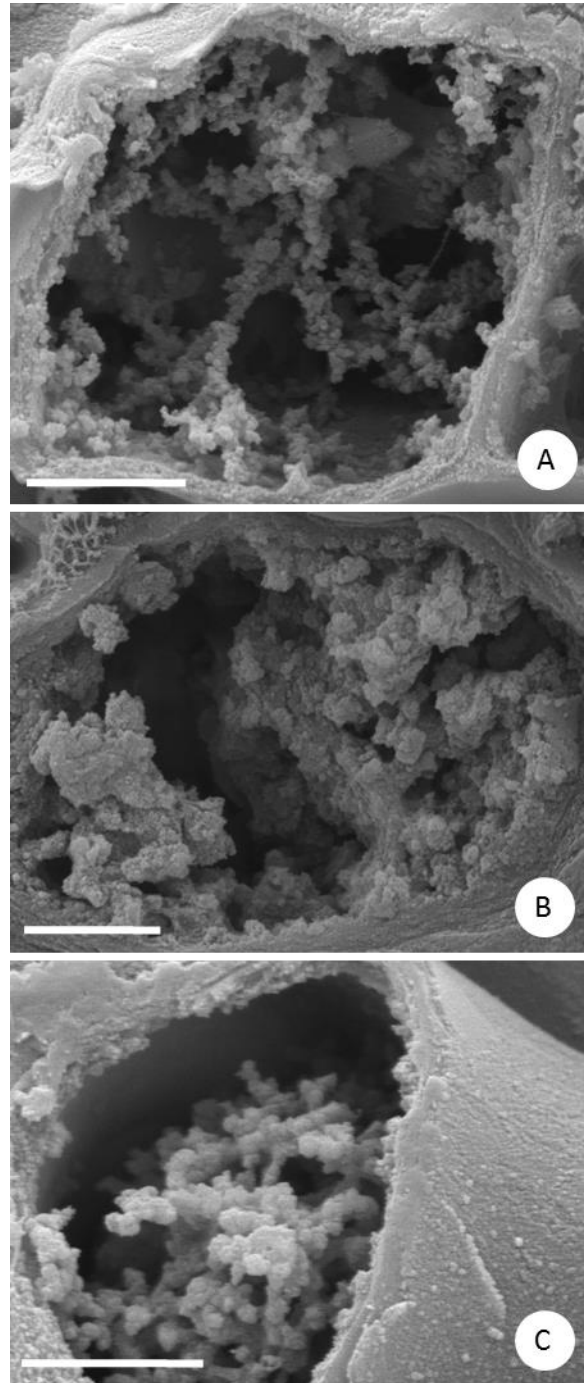
Table and Figure

213

214

216 **Table 1.** Colleter types and nature of secretion in Rubiaceae species from forest and
 217 savanna in central-western São Paulo State, Brazil.

| Species | Colleter type | Nature of secretion | Ecosystem | BOTU record |
|--|---------------|---------------------|-----------|-------------|
| <i>Alibertia concolor</i> (Cham.) K. Schum. | Dendroid | Resinous | forest | 28483 |
| <i>Ixora gardneriana</i> Benth. | Standard | Resinous | | 28488 |
| <i>Ixora heterodoxa</i> Müll. Arg. | Standard | Resinous | | 28492 |
| <i>Psychotria barbiflora</i> DC | Standard | Mucilaginous | | 28477 |
| <i>Psychotria marcgravii</i> (A.St.-Hil.) Spreng. | Standard | Mucilaginous | | 28501 |
| <i>Randia</i> sp. L. | Standard | Mucilaginous | | 28511 |
| <i>Richardia grandiflora</i> (Cham. & Schltld.) | Standard | Mucilaginous | | 28476 |
| <i>Simira corumbensis</i> (Standl.) Steyerm. | Standard | Mucilaginous | | 28490 |
| <i>Warzewickzia</i> sp. Klotzsch. | Standard | Mucilaginous | | 28513 |
| <i>Alibertia sessilis</i> (Vell.) K.Schum. | Dendroid | Resinous | savanna | 28505 |
| <i>Coccocypselum</i> sp. P. Browne | Standard | Mixed | | 28502 |
| <i>Coussarea hydrangaefolia</i> (Benth.) Benth. & Hook.f. ex Müll.Arg. | Lachrymiform | Mucilaginous | | 28499 |
| <i>Guettarda virbunoides</i> Cham. & Schltld. | Standard | Resinous | | 28482 |
| <i>Palicourea</i> sp. Aubl. | Standard | Resinous | | 28514 |
| <i>Palicourea rigida</i> Kunth. | Standard | Resinous | | 28484 |
| <i>Psychotria</i> sp. L. | Standard | Mucilaginous | | 28512 |
| <i>Tocoyena Formosa</i> Cham. & Schltld. | Standard | Mixed | | 28506 |



218

219 **Figure 1.** Cross sections of non-nodulated *Psychotria barbiflora* young leaves showing
220 bacterial mass inside epidermal (A) and mesophyll cells (B, C). Scale bar = 3 μm .

221

222 CONSIDERAÇÕES FINAIS

223

224 A comparação entre a diversidade de espécies contempladas no presente estudo,
225 distribuídas em vários gêneros ocorrentes em cerrado e floresta estacional semidecídua
226 associada à abordagem integrativa da caracterização morfológica, histoquímica,
227 ultraestrutural e ecológica dos coléteres, reforçaram a ideia de que coléteres do tipo
228 padrão são os mais comuns, mas variam em secreção, sugerindo papéis alternativos
229 dessas estruturas em cada ecossistema. A prevalência de lipídios e resina na secreção
230 dos coléteres foi relacionada com maior luminosidade e menor proporção de ápices
231 danificados em espécies do cerrado. Distintamente, no ecossistema florestal verificamos
232 uma associação entre maior umidade relativa do ar e maior proporção de ápices
233 danificados e ausência de lipídios e resinas na secreção. Assim, tornou-se evidente a
234 função de proteção contra desidratação e/ou radiação dos ápices vegetativos em cerrado,
235 enquanto o papel destas estruturas secretoras no ecossistema florestal parece incerto.

236 Ultraestruturalmente, observamos variação nos mecanismos de síntese e
237 liberação da secreção entre espécies com secreção predominantemente hidrofílica, mista
238 e predominantemente lipofílica. A combinação de métodos ultraestruturais
239 convencionais e ultracitoquímicos permitiu identificar a população de organelas e suas
240 propriedades funcionais nas células epiteliais de coléteres com secreções de naturezas
241 distintas, além de evidenciar os sítios intra e extracelulares de acúmulo temporário da
242 secreção e comprovar a participação da parede periclinal externa na liberação da
243 secreção.

244 Neste estudo registramos a ocorrência de endófitos em células do mesófilo de
245 *Psychotria barbiflora*, que pode ser indicativo de uma relação próxima com espécies
246 noduladas. No entanto, não encontramos nódulos bacterianos foliares nas espécies
247 estudadas, o que sugere que as características climáticas destes ambientes como a baixa
248 umidade relativa do ar e altas temperaturas sazonais possam causar a desidratação da
249 mucilagem impedindo o desenvolvimento de bactérias e formação de nódulos. Além
250 disso, a presença de alcaloides e compostos fenólicos nas células secretoras dos
251 coléteres pode ser um fator adicional que impede o estabelecimento desta simbiose.

252

253 **Referências bibliográficas**

254

255 Agostinelli C, Lund U. 2011. R package ‘circular’: Circular Statistics (version 0.4–3).

256 R-project website Available: <https://r-forge.r-project.org/projects/circular/>.

257 Accessed 2014 Sep 23.

258 Angermüller S., Fahimi D.H. 1982. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent

259 stain for visualization of lipids in transmission electron

260 microscopy. *Histochemistry Journal*. 14:823-825.

261 Barreiro D.P., Machado S.R. 2007. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K.

262 Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. *Revista Brasileira de Botânica*

263 30:387-399.

264 Bertachini-Lombello C., Carvalho H.F. 2013. Retículo endoplasmático. *In*: Carvalho

265 H.F., Recco-Pimentel S.M. *A Célula*. Barueri, SP: Manole, 2013.

266 Batschelet E. 1981. *Circular Statistics in Biology*. Academic Press, New York.

267 Carlquist S. 1969. Toward acceptable evolutionary interpretations of floral anatomy.

268 *Phytomorphology* 19:332–362.

269 Coelho V.P.M, Leite J.P.V., Fietto L.G., Ventrella M.C. 2013. Colleters in *Bathysa*

270 *cuspidate* (Rubiaceae): Development, ultrastructure and chemical composition of

271 the secretion. *Flora* 208:579 – 590.

272 Coley P.D., Kursar T.A. 1996. Anti-herbivore defences of young tropical leaves:

273 physiological constrains and ecological tradeoffs. *Tropical Forest Plant*

274 *Ecophysiology* (eds S.S. Mulkey & R.L. Chazdon), pp. 305–336

275 Compant S., Nowak J., Coenye T., Clément C., Barka E.A. 2008. Diversity and

276 occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS microbiology*

277 *reviews* 32:607-626.

278 Cortelazzo A.L. 1992. Detecção e quantificação do amido em cotilédones de *Canavalia*

279 *ensiformis* e *C. gladiata* durante o desenvolvimento inicial da planta. *Revista*

280 *Brasileira de Botânica* 15:157–62.

281 Coutinho, L.M. 1978. O conceito de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 1:17-23.

282 Coutinho L.M. 2002. O bioma do cerrado. *In*: Klein AL, ed. *Eugen Warming e o*

283 *cerrado brasileiro: um século depois*. São Paulo: Editora da Unesp, 77-91.

284 Cunha A.R., Martins D. 2009. Classificação climática para os municípios de Botucatu e

285 São Manuel-SP. *Irrigação* 14: 1-11.

- 286 Dave Y., Kuriachen P.M., Thomas V. 1988. Development, structure and senescence of
287 colleters in *Gardenia lucida* Roxb. (Rubiaceae). *Acta Societatis Botanicorum*
288 *Poloniae* 57:3-7.
- 289 Delprete P.G., Jardim J.G. 2012. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian
290 Rubiaceae: an overview about the current status and future challenge. *Rodriguésia*
291 63:101–128.
- 292 Dhingra O.D., Sinclair J.B. 1995. *Basic plant pathology methods*, 2nd Ed. CRC Press
293 London. p. 434.
- 294 Evert, R.F. 2006. *Esau's Plant Anatomy, Meristems, Cells, and Tissues of the Plant*
295 *Body: Their Structure, Function, and Development*. John Wiley & Sons, Inc., New
296 Jersey.
- 297 Evert R.F. 2013. *Anatomia das plantas de Esau, meristemas, células e tecidos do corpo*
298 *da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento* trad. Da 3ª ed. Americana –
299 São Paulo: Blucher, 2013.
- 300 Fahn A. 1979. *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- 301 Fahn A. 1990. *Plant anatomy*. Oxford: Pergamon Press.
- 302 Fahn A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical*
303 *Research* 31:37-75.
- 304 Fournier L.A. 1974. Un método quantitativo para la medición de características
305 fenológicas en árboles. *Turrialba* 24:422-423.
- 306 Franceschi V.R., Nakata P.A. 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and Function.
307 *Annual Review of Plant Biology* 56:41-71.
- 308 Gilloteaux J., Naud J. 1979. The zinc iodide-osmium tetroxide staining-fixative of
309 Maillet. *Histochemistry* 63:227-243.
- 310 González A.M. 1998. Colleters in *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). *Botanical*
311 *Journal of the Linnean Society* 128:215-228.
- 312 Harborne J.B., Baxter H., Moss G.P. 1999. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of*
313 *bioactive compounds from plants*. 2th edn. London: Taylor and Francis.
- 314 Horner H.T., Lersten N.R. 1968. Development, structure and function of secretory
315 trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*
316 55:1089–1099.
- 317 Jammalamadaka S.R., Sem-Gupta A. 2001. *Topics in Circular Statistics*, World
318 Scientific, New York.

- 319 Jeffree C.E. 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. Plant cuticles: an integrated
320 functional approach. BIOS Scientific Publishers Ltd.: Oxford, UK, 33-82.
- 321 Jensen W.A. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco: W.
322 H. Freeman and Co.
- 323 Johansen D.A. 1940. Plant microtechnique. New York: Paul B. Hoeber, Inc.
- 324 Johansson J.T. 1987. Revision of the genus *Prismatomeris* Thw. (Rubiaceae,
325 Morindeae). Opera Botanica 94:1-62.
- 326 Karnovsky M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for
327 use in electron microscopy. Journal of Cell Biology 27:137A-138.
- 328 Kim E.S., Mahlberg P.G. 1995. Glandular cuticle formation in *Cannabis*
329 (*Cannabaceae*). American Journal of Botany 82:1207-1214.
- 330 Klein D.E., Gomes V.M., Silva-Neto S.J., Cunha M. 2004. The structure of colleters in
331 several species of *Simira* (Rubiaceae). Annals of Botany 94:733-740.
- 332 Kronstedt-Robards E., Robards A. 1991. Exocytosis in gland cells. In Endocytosis,
333 exocytosis and vesicle traffic in plants (C. Hawea, J. Coleman & D. Evans, eds.).
334 Cambridge University Press, Cambridge, p.199-232.
- 335 Lemaire B., Robbrecht E., van Wyk B., Van Oevelen S., Verstraete B., Prinsen E.,
336 Smets E., Dessein S. 2011. Identification, origin and evolution of leaf nodulating
337 symbionts of *Sericanthe* (Rubiaceae). Journal Microbiology. 49:935-941.
- 338 Lemaire B., Van Oevelen S., De Block P., Verstraete B., Smets E., Prinsen E., Dessein
339 S. 2012a. Identification of the bacterial endosymbionts in leaf nodules of *Pavetta*
340 (Rubiaceae). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
341 62:202-209.
- 342 Lemaire B., Lachenaud O., Persson C., Smets E., Dessein S. 2012b. Screening for leaf-
343 associated endophytes in genus *Psychotria* (Rubiaceae). FEMS Microbiology
344 Ecology 81:364-72.
- 345 Lersten N.R., Horner H.T. 1967. Development and structure of bacterial leaf nodules in
346 *Psychotria bacteriophila* Val. (Rubiaceae). Journal of Bacteriology 94:2027-2036.
- 347 Lersten N.R. 1974a. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to
348 the taxonomy and bacterial leaf nodules in *Psychotria* (Rubiaceae). American
349 Journal of Botany 61:973-981.
- 350 Lersten N.R. 1974b. Colleter morphology in *Pavetta*, *Neorosea* and *Tricalysia*
351 (Rubiaceae) and its relationship to the bacterial leaf nodule symbiosis. Botanical
352 Journal of Linnean Society 69:125-136.

353 Lersten N.R. 1975. Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial
354 leaf nodule symbiosis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 71:311-319.

355 Machado S.R., Gregório E.A. 2001. Zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reactive sites
356 in the extrafloral nectary of *Citharexylum mirianthum* Cham. (Verbenaceae).
357 *Tissue & Cell* 33:72-77.

358 Machado S.R., Barreiro D.P., Rocha J.F., Rodrigues T.M. 2012. Dendroid colleters on
359 vegetative and reproductive apices in *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) differ in
360 ultrastructure and secretion. *Flora* 207:868– 877.

361 Maillet M. 1962. Le reactif au tetraoxyde d'osmium-iodure au zinc. *Z. Zellforsch*
362 70:397-406.

363 Martins F.M. 2012. Leaf and calycine colleters in *Odontadenia lutea* (Apocynaceae –
364 Apocynoideae – Odontadenieae): their structure and histochemistry. *Brazilian*
365 *Journal of Botany* 35:59-69.

366 Mayer J.M.S., Cardoso-Gustavson P., Appezzato-da-Gloria B. 2011. Colleters in
367 monocots: New record for Orchidaceae. *Flora* 206:185–190.

368 Mayer J.M.S., Carmello-Guerreiro S.M., Mazzafera P. 2013. A functional role for the
369 colleters of coffee flowers. *Annals of Botany* 5: plt029. doi:10.1093/aobpla/plt029.

370 Mazia D., Brewer P.A., Alfert M. 1953. The cytochemical staining and measurement of
371 protein with mercuric bromophenol blue. *The Biological Bulletin* 104:57–67.

372 Melo M.O., Silva-Filho M.C. 2002. Plant-insect interaction: an evolutionary arms race
373 between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*
374 14:71–81.

375 Miller, I.M. 1990. Bacterial leaf nodule symbiosis. *Advanced Botanical Research*
376 17:163–243.

377 Miguel E.C., Gomes V.M., Oliveira M.A., Da Cunha M. 2006. Colleters in *Bathysa*
378 *nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): Ultrastructure, Secretion Protein Composition,
379 and Antifungal Activity. *Plant Biology* 8:715–722.

380 Miguel E.C., Moraes D.G., Da Cunha M. 2009. Stipular colleters in *Psychotria nuda*
381 (Cham. e Schltdl.) Wawra (Rubiaceae): micromorphology, anatomy and cristals
382 microanalysis. *Acta Botanica Brasilica* 23:1034–1039.

383 Miguel E.M., Klein D.E., Oliveira M.A., Da Cunha M. 2010. Ultrastructure of secretory
384 and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulata*
385 (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 33:425-436.

386 Mithöfer A., Boland W. 2012. Plant defense against herbivores: Chemical aspects.
387 Annual Review of Plant Biology 63:431-450.

388 Muravnik L.E., Kostina O.V., Shavarda A.L. 2014. Development, structure and
389 secretion compounds of stipule colleters in *Pentas lanceolata* (Rubiaceae). South
390 African Journal of Botany 93:27-36.

391 Nicolson S.W., Nepi M., Pacini W. 2007. Nectaries and nectar. Springer-Verlag,
392 Dordrecht, The Netherlands.

393 Nogueira A., Guimarães E., Machado S.R., Lohmann L.G. 2012. Do extrafloral nectaries
394 present a defensive role against herbivores in two species of the family
395 Bignoniaceae in a Neotropical savannas? Plant Ecology (Dordrecht) 213:289-301.

396 Oliveira M.C., Simões K., Braga M.R. 2009. Substâncias antifúngicas constitutivas e
397 induzidas em folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll.
398 Arg. (Rubiaceae). Revista Brasileira de Botânica 32:509-519

399 Paiva E.A.S, Machado S.R. 2006. Colleter in *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae):
400 ontogenesis, ultrastructure and secretion. Brazilian Journal of Biology 66:301-308.

401 Paiva E.A.S. 2009. Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of
402 *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, caesalpinioideae). Comptes Rendus
403 Biologies. 332:1078–1084.

404 Paiva E.A.S. 2012. Colleters in *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae): structure,
405 secretion and evidences for young leaf protection. The Journal of the Torrey
406 Botanical Society 139:1-8.

407 Pearse A.G.E. 1980. Histochemistry, theoretical and applied: preparative and optical
408 technology. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingston.

409 Pizzolato T.D., Lillie R.D. 1973. Mayer's tannicacid-ferric chloride stain for mucins.
410 The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 21:56–64.

411 Reinecke M., Walther, C. 1978. Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles
412 at locust neuromuscular junctions as reveled by iodide-osmium tetroxide (ZIO)
413 reacting with intravesicular sh-groups. Journal of Cell Biology 21:839-855.

414 Reynolds E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in
415 electron microscopy. The Journal of cell biology 17:208-212.

416 Robards A.W. 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of
417 plant cells. In: Hall JL, ed. Electron microscopy and cytochemistry of plant cells.
418 New York: Elsevier, 343–403.

- 419 Robbrecht E. 1987. The African genus *Tricalysia* A. Rich. (Rubiaceae). A revision of
420 the species of section *Tricalysia* and section *Rosea*. Bulletin van Nationale
421 Plantentuin van Belgie 57:39–208.
- 422 Robbrecht E. 1988. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions.
423 Contributions to a new subfamilial classification. Opera Botanica Belgica 1:1–271.
- 424 Roshchina V.V., Roshchina V.D. 1993. Excretory function of higher plants. Springer-
425 Verlag.
- 426 Souza V.C., Lorenzi H. 2005. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das
427 famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa:
428 Instituto Plantarum.
- 429 Svendsen A.B., Verpoorte R. 1983. Chromatography of alkaloids. New York: Elsevier
430 Scientific Publishing Company.
- 431 Thomas V, Dave Y. 1989. Structure, origin, development and senescence of colleters in
432 *Nerium indicum* Mill. (*N. odorum* Soland Apocynaceae). Korean Journal of Botany
433 32:163-172.
- 434 Thomas V. 1991. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleters.
435 Annals of Botany 68:287–305.
- 436 Trigo J.R., Pareja M., Massuda K.F. 2012. O papel das substâncias químicas nas
437 interações entre plantas e insetos herbívoros. In: Del-Claro K, Torezan-Silingardi
438 HM, eds. Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-
439 evolutivo. Rio de Janeiro: Technical Books Editora 67–88.
- 440 Van Oevelen S., Prinsen E., De Wachter R., Robbrecht E. 2001. The taxonomic value
441 of bacterial symbiont identification in African *Psychotria* (Rubiaceae). Systematics
442 and Geography of Plants 557-563.
- 443 Van Oevelen S., De Wachter P., Robbrecht E., Prinsen E. 2003. Induction of a crippled
444 phenotype in *Psychotria* (Rubiaceae) upon loss of the bacterial endophyte.
445 Bulgaria Journal Physiology, Especial issue 242–24.
- 446 Van Oevelen S., De Wachter R., Vandamme P., Robbrecht E., Prinsen E. 2004.
447 Candidatus *Burkholderia calva* and ‘Candidatus *Burkholderia nigropunctata*’ as
448 leaf gall endosymbionts of African *Psychotria*. International Journal Systematic
449 and Evolutionary Microbiology 54: 2237–2239.
- 450 Van Oevelen, D., Soetaert K., Heip C. 2012. Carbon flows in the benthic food web of
451 the Porcupine Abyssal Plain: The (un) importance of labile detritus in supporting
452 microbial and faunal carbon demands. Limnology and Oceanography 57: 645-664.

- 453 Vitarelli N.C., Santos M. 2009. Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria*
454 *cartagenensis* Jacq. (Rubiaceae). Acta Botanica Brasílica 23:923–928.
- 455 Walter H., Lieth H. 1967. Klimadiagramm-Weltatlas. Jena: Pust. Gustav Fischer.
- 456 Zar JH. 2010. Biostatistical Analysis. 5th edition. Prentice Hill. 944pp.
- 457
- 458
- 459